

Aflatoksin B₁'in Zebra balığının (*Danio rerio* (Hamilton)) Embriyo ve Larvaları Üzerine Olan Toksik Etkileri

TURGAY ŞİŞMAN¹, YILMAZ YILDIRIM²

¹Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü / ERZURUM

²Kağıthane Atatürk İlköğretim Okulu, Seyrantepe Mah., A.Yokuşu Cad., Can Sok., No:2- Kağıthane / İSTANBUL
Alınış Tarihi: 14.09.2006, Kabul: 23.05.2007

Özet: Bu çalışmada, toksik bir küf metaboliti olan Aflatoksin B₁ (AFB₁)'in *Danio rerio* embriyolarının gelişimi üzerine olan teratojenik etkileri araştırılmıştır. Artan konsantrasyonlarda AFB₁ uygulanan balık embriyolarında çeşitli anormallikler 96 saat süreyle gözlenmiştir (24hpf, 48 hpf, 72 hpf, 96 hpf). Bu anormallikler Raşisis (gelişimde gerileme), Lordoz (vertebra anormallığı), kardiyak ödemi, çeşitli vücut kısımlarının oluşmamasıdır. AFB₁'e maruz kalma süresi ve konsantrasyon arttıkça anormalliklerin görülme sıklığı ve ölümler de artmıştır. Hemen hemen bütün dozlarda anormallikler gözlenmiş ancak kontrol gruplarında hiçbir anormallik gözlenmemiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). AFB₁'in neden olduğu malformasyonların olası mekanizması tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Danio Rerio*, AFB₁, Teratojenik Etki, Embriyo, Larva.

The Toxic Effects of Aflatoxin B₁ on the Embryos and Larvae of Zebrafish (*Danio rerio* (Hamilton))

Abstract: In the current study, the teratogenic effects of Aflatoxin B₁, a toxic mold metabolite, on the development of embryos and larvae of *Danio rerio* were investigated. The various abnormalities were observed in fish embryos and larvae exposed to increasing concentrations of AFB₁ during 96 hours (24 hpf, 48 hf, 72 hpf and 96 hpf). This abnormalities are Rachisis (regression of development), Lordosis (tail defect), cardiac edema, not formed of various body structures. Mortality and frequency of occurring abnormalities increased when it was increased the time of exposed to AFB₁ and concentration. Abnormalities were observed in almost all doses. Abnormalities were not observed in control groups. It was found that the difference between control and test groups is statistically significant (P<0.05). The possible mechanism of the malformations caused by AFB₁ was discussed.

Keywords: *Danio Rerio*, AFB₁, Teratogenic Effect, Embryo, Larva.

Giriş

Mikotoksinler, birçok toksijenik küf türü tarafından sentezlenen, insan ve hayvanlar tarafından alındıklarında, akut ya da kronik intoksikasyonlara neden olan sekonder metabolitlerdir. Yaklaşık 300 küf türünün mikotoksin oluşturduğu, bunların içinden 100 tanesinin insan ve hayvanlar için toksik olduğu bilinmektedir. Yapılan deneysel çalışmalara göre toksik etkisi en yüksek olan mikotoksinlerden birisi olarak aflatoksinler gösterilmektedir.

Aflatoksinler, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* adı verilen funguslar tarafından üretilen son derece toksik, mutajenik, karsinojenik, hepatotoksik ve teratojenik sekonder metabolitlerdir. Bu funguslar bir çok ürünü kontamine etmekte ve kontamine ürünler de insan ve birçok çiftlik hayvanının sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Aflatoksikozis olaylarının yaklaşık %75-83'üne neden olan Aflatoksin B₁ (AFB₁), doğada yem maddelerinin üzerinde üreyen küflerin en yaygın metabolitidir. Aflatoksinin 18 ayrı türü bulunmasına rağmen yem ve yem maddelerinde en fazla tespit edilenler AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂'dir (Hartley vd., 1963). Aflatoksinli besinleri alan insan ve hayvanlarda akut, subakut ve kronik aflatoksikozis görülür. Akut zehirlenmeler oldukça fazla miktarda (6.3-15.6 ppm) aflatoksin alımı ile gerçekleşir ve solunum güçlüğü, burun

akıntısı, besinlerden yararlanma isteğinin kaybolması (anoreksi), vücut dengesi ile hareket uyumu arasındaki anormallik (ataksi), iştahsızlık, kanlı ishal ve sonuçta ölüm meydana gelir.

Düşük dozlarda ve uzun süre aflatoksin alınımına bağlı olarak ortaya çıkan kronik zehirlenmeler akut zehirlenmeye oranla daha sık ve yaygın olarak görülmektedir. Bu tip zehirlenmelerde klinik belirtiler genelde net olmadığından, tanımlanmaları oldukça güçtür ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Aflatoksinlerden uzun süre etkilenmiş hayvanlarda yem tüketimi, yemden yararlanma etkinliği, büyüme hızı veya canlı ağırlık artış oranı oldukça düşer. Kıl örtüsü zayıflar, anemi, karın büyümesi, hafif derecede sarılık, depresyon, iştahsızlık, immun sistemin yetersizliği, stres koşullarına uyum yeteneğinin azalması, hastalıklara karşı dirençsizlik ve ölüm oranlarının artması gibi belirtiler ortaya çıkar. Farklı canlı gruplarında, toksik etki meydana getiren aflatoksinlerin, LD₅₀ değerleri yaşa, cinsiyete, türe, beslenme tarzına, vücut ağırlığına ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir (Patterson, 1973; Davis ve Diener, 1978).

Aflatoksinlerin omurgasız hayvanlar üzerindeki insektisit ve larvisit etkileri, çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. AFB₁ ile kontamine edilmiş besiyerinde

yetiştirilen *D. melanogaster* türünde larval ve pupal mortalite artmış ve çeşitli teratojenik etkiler gözlenmiştir (Chinnici vd., 1976; Lalor vd., 1976). Benzer bir araştırmada ise AFB₁'in ergin sineklerin kanat, bacak ve abdomeninde çeşitli fenotipik anormallikler meydana getirdiği (Uysal ve Şişman, 2003) ve *Drosophila melanogaster* türünde hem otozomal, hem de eşeye bağlı karakterleri etkilediği belirtilmektedir (Chinnici ve Melone, 1985; Şişman vd., 2005).

Ancak yapılan literatür çalışmalarında AFB₁'in Zebra balığının embriyoları üzerindeki etkileri ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Bu araştırmada, Aflatoksin B₁'in Zebra balığının embriyoları üzerindeki teratojenik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Zebra Balığı Kültürleri, Yetiştirilmesi ve Yumurtalarının Toplanması

Damızlık Zebra balıkları İstanbuldaki akvaryumculardan temin edilmiştir. Balıklar 40x60x100 cm (yükseklik, en, boy) ebadında stok akvaryumda yetiştirilmiş ve yemleme günde 2-3 kez yapılmıştır. Akvaryumun bulunduğu ortam fotoperiyodu sağlamak için 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde ışıklandırılmış, suyun sıcaklığı 28 °C'ye ve pH 7 olacak şekilde ayarlanmıştır (Hallare vd., 2004). Yumurta toplamak için, yumurta toplanması amaçlanan günden 1 hafta önce, balıklar hafta boyunca canlı yemlerle (*Daphnia*, *Paramecium*, *Rotifera* gibi) beslenmiştir. Sonra 2 dişiye 3 erkek gelecek şekilde 24x28x40 cm ebadında çiftleştirme akvaryumlarına bırakılmıştır. Balıkların kendi yumurtalarını yemelerini önlemek amacıyla, akvaryumlar içine 2 mm aralığı olan naylon tülden yapılmış küçük kafesler yerleştirilmiştir. Daha önceden fotoperiyoda alışkın olan balıklar, yumurta toplanacak günden bir gün önce, bu akvaryumlara bırakılmış ve ertesi sabah döllenmiş yumurtalar tül kafesler içinde gözlenmiştir. Kafeslerden toplanan yumurtalar, denemelere başlayınca kadar Holtfreter solüsyonu bulunan petrilere bekletilmiştir (Küçükkoğlu, 1996).

Embriyo ve Larval Toksikite Testi (ELS Testi)

Günümüzde balıklar için zararlı kimyasalların araştırılmasında çeşitli teratojenite testleri kullanılmaktadır. Bu testler mortalite, ölüm oranı, çeşitli malformasyonlar (fenotipik ve gelişimsel anormallikler) ve bu malformasyonların sonraki nesilde ortaya çıkıp çıkmadığına dayanmaktadır.

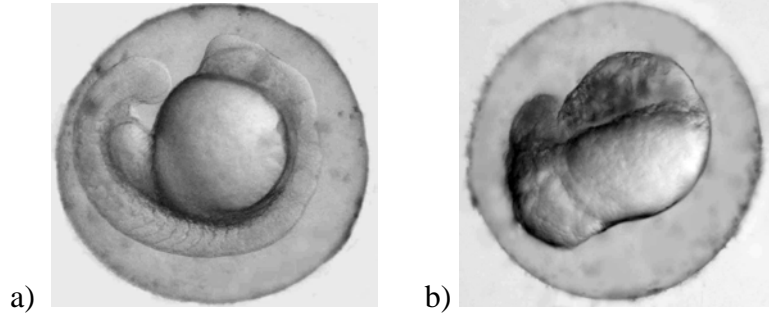
Bu testlerden en yaygın kullanılanı ve en güvenilir olanı ELS (Early Life Stage) Testi'dir (Nagel, 2002; Roex vd., 2002; Hallare vd., 2004; Hutchinson vd., 2003). Bu araştırmada, AFB₁'in toksisitesini belirlemek amacıyla, bu test kullanılmıştır. Bu teste göre, toksisitesinden şüphelenilen kimyasal madde, yeni döllenmiş balık yumurtalarına farklı dozlarda 96 saat süreyle uygulanır. 48 saatte embriyoların yarısını öldüren doz, olarak belirlenir. LD₅₀ değerinin bir alt dozu (subletal) uygulama dozu olarak belirlenir ve 96 saatlik uygulama sonucunda çeşitli anormallikler gözlenirse uygulanan maddenin toksik olduğuna hükmedilir.

Embriyo ve Larvalara AFB₁'nin Uygulanması

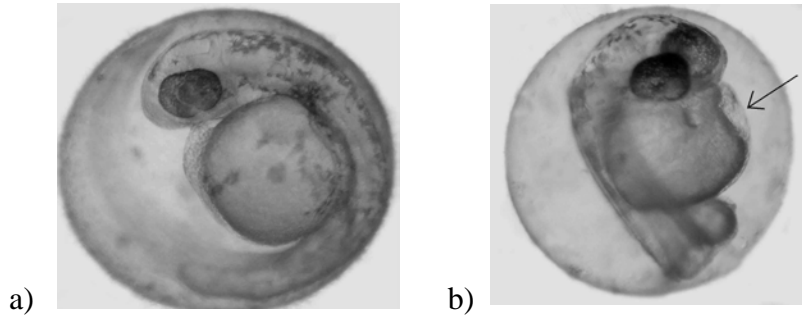
Bunun için AFB₁'den 10 ppm'lik stok solüsyon hazırlanmıştır (1 mg AFB₁ %10'luk 100 ml DMSO içinde çözündürülür) ve bu solüsyondan 5 farklı konsantrasyonda (0.2, 0.5, 0.8, 1.4, 1.7 ve 2.0 ppm) uygulama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak 50 ml Holtfreter Solüsyonu ve 50 ml %10'luk DMSO kullanılmıştır. Döllenmiş yumurtalar (her petri için 30 adet) içinde 50 ml Holtfreter Solüsyonu+ AFB₁ bulunan petri kaplarına alınmış, 14:10 fotoperiyot uygulanan bir ortamda 26 °C'ye ayarlı inkübatöre yerleştirilmiştir. Gözlemler 24, 48, 72 ve 96 saat aralıklarla yapılmış ve her 24 saatte bir petri içlerindeki solüsyonlar yenilenmiştir (Hallare vd., 2004). Kontrol ve deney gruplarında meydana gelen değişiklikler dijital kamera destekli stereo mikroskopla gözlenip fotoğrafları çekilmiştir.

Bulgular

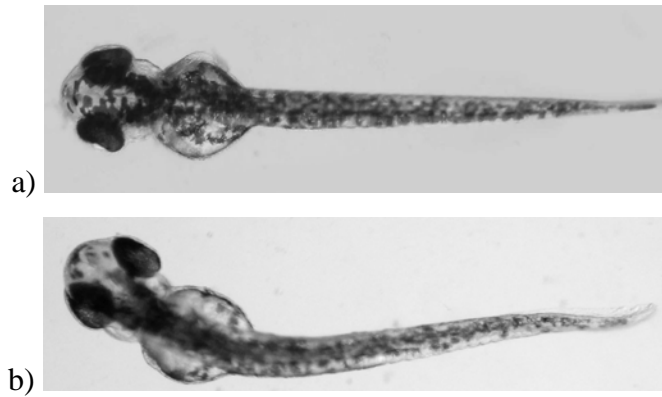
Zebra balığı embriyolarına 48 saatlik AFB₁ uygulanması sonucunda, probit analizi kullanılarak LD₅₀ değeri 1.4 ppm olarak hesaplanmıştır. Buna bağlı olarak subletal doz (0.8 ppm) AFB₁'in 96 saatlik uygulama sonucunda ise gelişimsel oran düşmüş, teratojenik malformasyonlar ile embriyonik ve larval ölümler artmıştır. Bu anormallikler 72 saate kadar embriyo ve larvalarda gelişimde gerileme (Raşisis), vertebra anormalliği (Lordoz), kardiak ödemi, nonpigmentasyon, çeşitli vücut kısımlarının oluşmaması ve eksik gelişimi şeklinde ortaya çıkmıştır (Şekil-3). Özellikle koryondan çıkışlarda gecikmenin gözlemlendiği larvalarda anormalliklerin diğerlerine göre daha fazla meydana geldiği tespit edilmiştir. Anormallik gösteren larvalar normal ortama alındıklarında en fazla 20 gün yaşadıkları ve sonra öldükleri gözlenmiştir.



Şekil 1. a) Normal embriyo (24 hpf: hour post fertilization), b) Raşısız (göz ve diğer yapıları gelişmemiş embriyo) görülen 24 saatlik embriyo (0.8 ppm AFB₁).



Şekil 2. a) Normal embriyo (48 hpf), b) Kardiyak ödem (ok) ve nonpigmentasyon görülen 48 saatlik embriyo (0.8 ppm AFB₁).



Şekil 3. a) Normal embriyo (72hpf), b) Lordoz (vertebra anormalliği) görülen 72 saatlik embriyo (0.5 ppm AFB₁).

Çizelge 1. Çeşitli dozlarda AFB₁'e maruz kalmış Zebra balığı embriyolarında gözlemlenen anormallik tipleri ve % olarak oranı.

Gelişimsel Tipleri	Anormallik	Kontro	DMS	Aflatoksin B1 (ppm)					
				0,2	0,5	0,8	1,4	1,7	2,0
Raşısız		0	0	12	22	39*	53*	a	a
Kardiyak ödem		0	0	18	25*	35*	51*	a	a
Nonpigmentasyon		0	0	15	22	32*	49*	a	a
Lordoz		0	0	37*	48*	67*	75*	a	a
Non-Hatching		3	3	10	15	30*	59*	100	100

A Larvalar yumurtadan çıkamadıkları ve öldükleri için anormallik tespiti yapılamamıştır.

*Kontrol ve deney grupları arasındaki farkın önem seviyesi ($P < 0.05$).

96 saatlik embriyolar ise, koryondan çıkamadıklarından (non-hatching) ve çoğu öldüğünden anormallik teşhisi yapılamamıştır. Anormalliklerin şiddetine bakıldığında ise en fazla gözlemlenen anormallik tipinin Lordoz yani vertebra defekti olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, AFB₁'in Zebra balığının embriyoları üzerine olan teratojenik etkileri incelenmiştir. Bu incelemelerde AFB₁'in balık embriyolarında çeşitli hatalara yol açtığı belirlenmiştir. Bunların başlıcaları ölümlerin artması, gelişimde gerileme, çeşitli vücut kısımlarının oluşmaması ve vertebra defektleridir. Bulgularımızı daha önceki araştırmacıların bulguları da destekler doğrultudadır. Ancak yapılan literatür çalışmalarında, AFB₁'in Zebra balığının embriyoları üzerine olan teratojenik etkisiyle ilgili direkt sonuçlara rastlanılmamıştır. Bu nedenle bulgularımız, bu balıkların erginleri ve diğer bazı farklı organizmalardan elde edilen çalışma sonuçları ışığında değerlendirilecektir.

Aflatoxinlerle ilgili çalışmalarda, aflatoxinlerin rat ve gökkuşuğu alabalığında (Lancaster vd., 1961) çiftlik hayvanlarında (Alleroft, 1965) ve maymunlarda (Adamson vd., 1973) karsinojenik ve toksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Adamson vd. (1973) tarafından yapılan çalışmalarda, bir dişi maymuna iki hafta boyunca, günde üç kere 800 µg/kg aflatoxin içeren besinler yedirilmiş ve bu hayvanlarda önce sarılık ve halsizlik, ardından karaciğer kanseri görülmüştür. Bu sonuçlar çeşitli araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır (Campbell ve Stoloff, 1974; Dvorak vd., 1977; Pier, 1981). Mikotoksinler ve özellikle aflatoxinler DNA, RNA ve protein gibi hücresel makromoleküllere afinite gösterirler ve onların sentezini inhibe ederler. DNA'ya bağlı RNA polimeraz aktivitesi de bloke edilir (McLean ve Dutton, 1995). Allison ve Paton (1965)'e göre de sekonder metabolitler, lizozomal enzimlerin aktivitesini engelleyerek kromozomal hatalara sebep olurlar. Makromoleküllerin bu inhibisyonundan, sitokrom p-450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz gibi bir takım enzimlerin etkisi sonucu ortaya çıkan metabolitlerin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Cavin vd., 1998). Bu metabolitler ise muhtemelen, AFB₁-8,9-epoksit (Busby ve Wogan, 1984) ve AFB₁-2,3-epoksittir (Benasutti vd., 1988). Moleküler düzeyde yapılan araştırmalar, AFB₁ metabolitlerinin hücre DNA'sına bağlandığını (Gradelet vd., 1998), hedef bazın guanin olduğunu (Lyman vd., 1988) ve AFB₁-8,9 epoksidin DNA'daki guanine bağlanarak 8,9 dihidro-9-hidroksi (N7-guanil) AFB₁ formu oluştuğunu göstermiştir (Benasutti vd., 1988). Bu form AFB₁- DNA kompleksinin %90'ını oluşturmakta ve böylece DNA'da promutajenik alanın artmasıyla tümör oluşumu başlamış olmaktadır. Yapılan diğer bir araştırmada, ergin Zebra balıklarına 50-400 µg/kg arasında değişen dozlarda AFB₁ 24 saat süreyle injekte edilmiş ve sonuçta karaciğer kanseri gözlemlenmiştir. Bu durum ise AFB₁'in balık vücudunda hızlı bir şekilde metabolize olarak (biyoaktivasyon ve biyoakümülyasyon) DNA'ya bağlanmasıyla izah edilmiştir (Toxel vd., 1997).

Sonuç olarak denilebilir ki, AFB₁ Zebra balığının embriyoları üzerinde teratojenik etkiye sebep olmaktadır. Genetik yapıdaki düzensizliklerden dolayı ksenobiyotik (xenobiotik) metabolizma enzimlerinin eksikliği ya da sentezlenmemesi (arilhidrokarbon hidroksilaz gibi) detoksifikasyon mekanizmasının çalışmasını engellemekte; bu da Zebra balığının çeşitli gelişim dönemlerinde toksik etki ya da mortaliteye sebep olmaktadır.

Kaynaklar

- Adamson, R.H., Correa, P., Dalgaard, D.W. 1973. Brief communication. Occurrence of a primary liver carcinoma in a Rhesus monkey fed aflatoxin B₁. Journal of National Cancer Institute, 50, 549-553.
- Alleroft, R. 1965. Aspects of aflatoxicosis in domestic animals. In: Wogan, G. N. (edit.) Mycotoxins in Foodstuffs: Proceedings of MIT Symposium, March 18-19, 1964. Cambridge, MA, 153-162.
- Allison, A.C., Paton, G.R. 1965. Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. Nature (London), 207, 1170.
- Benasutti, M., Ejadi, S., Whitlow, M.D., Loechler, E.L. 1988. Mapping the binding site of aflatoxin B₁ in DNA: Systematic analysis of reactivity of aflatoxin B₁ with guanines in different DNA sequences. Biochemistry, 27, 472-481.
- Busby, W.R.J., Wogan, G.N. 1984. Aflatoxins. In CE Searle (ed.), Chemical Carcinogen, ed. 2, 945-1136. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Campbell, T.C., Stoloff, L. 1974. Implication of mycotoxins for human health. Journal of Agricultural Food Chemistry, 22, 1006-1015.
- Cavin, C., Holzhauser, D., Constable, A., Huggett, A.C., Schilter, B. 1998. The coffee specific diterpens cafestol and kahweol protect against aflatoxin – induced genotoxicity through a dual mechanism. Carcinogenesis, 19, 1396-1375
- Chinnici, J.P., Booker, M.A., Llewellyn, G.C. 1976. Effect of aflatoxin B₁ on viability, growth, fertility and crossing over in *D. melanogaster* (Dip.). Journal of Invertebral Pathology, 27, 255-258.
- Chinnici, J.P., Melone, P.D. 1985. Genetic aspects of aflatoxin B₁ resistance in *Drosophila melanogaster*. Journal of Heredity, 76, 85- 88.
- Davis, N.D., Diener, U.L. 1978. Mycotoxins. In Food and Beverage Mycol, 1, 397-444.
- Dvorak, R., Jagos, J., Bouda, J., Piskac, A., Zoplattel, O. 1977. Changes in the clinico-biochemical indices in the rumen liquor and urine in caes of experimental aflatoxicosis in dairy cows. Veterinary Medicine (Prague), 22, 161-169.

- Gradelet, S., Le Bon, A.M., Berges, P., Suschelet, M., Astorg, P. 1998. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B₁-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in therat: Role of the modulation of aflatoxin B₁ metabolism. *Carcinogenesis*, 19, 403-411
- Hallare, A.V., Köhler, H-R., Triebkorn, R, 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, 56, 659-666.
- Hartley, R.D., Nesbitt, B.F., O'Kelly, J. 1963. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 198, 1056-1058.
- Hutchinson, T.H., Barrett, S., Buzby, M., Carstable, D., Hartmann, A., Hayes, E., Hugget, D., Laenge, R., Lillcrap, A.D., Straub, J.O., Thompson, R.S. 2003. A strategy to reduce the numbers of fish used in acute ecotoxicity testing of pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 3031-3036.
- Küçüköğlü, M. 1996. Zebra Balığının (*Brachydanio rerio*) embriyolojik gelişimi üzerine kadmiyum klorür ve çinko klorür gibi çevre kirleticilerinin etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ç. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 53s.
- Lalor, J.H., Chinnici, J.P., Llewellyn, G.C. 1976. Effect of a fungal metabolite, AFB₁, on larval viability and gross morphology in *D. melanogaster*. *Developmental Industrial Microbiology*, 17, 443-449.
- Lancaster, M.C., Jenkins, F.P., Philip, J.M. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature (London)*, 192, 1095-1096.
- Lyman, B.A., Erki, L., Biedrzycka, D.W., Devlin, T.M., Chich, J.J. 1988. Modification of protein synthetic components by aflatoxin B₁. *Biochemical Pharmacology*, 37, 1481-1486.
- McLean, M., Dutton, M.F. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology and Therapeutics*, 65, 163-192.
- Nagel, R. 2002. Dart: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio*- a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex Alternative Tierexperimental*, 19, 38-48.
- Patterson, D.S.P. 1973. Metabolism as a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animals species. *Food and Cosmetics Toxicology*, 11, 287-294.
- Pier, A.C. 1981. Mycotoxin and animal health. *Advances in Veterinary Science Comparison Medicine*, 25, 185-243.
- Roex, E.W.M., de Vries, E., van Gestel, C.A.M. 2002. Sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*) early life stage test for compounds with different modes of action. *Environmental Pollution*, 120, 355-362.
- Şişman, T., Uysal, H., Aşkın, H. 2005. The clastogenic effects of Aflatoxin B₁ (AFB₁) on polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*, 88, 1-6.
- Troxel, C.M., Reddy, A.P., O'neal, P.E., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. 1997. In vivo aflatoxin B₁ metabolism and hepatic DNA adduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143, 213-220.
- Uysal, H., Şişman, T. 2003. The effects of aflatoxin B₁ on some development stages and phenotypic abnormalities in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*, 86, 22-26.