

SİÇANLARDA *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. KÖK EKSTRESİNİN AFLATOKSİN B1'İN NEDEN OLDUĞU KROMOZOM KIRIKLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Hülyam KURT, Ayşe BAŞARAN

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
ESKİŞEHİR

ÖZET

Bu çalışmada, sıçanlarda aflatoksin B1'in (AfB1) neden olduğu kromozom kırıkları ve lökosit tipleri üzerine *Arnebia densiflora* (*A.densiflora*) kök ekstresinin etkileri araştırıldı.

Çalışmada, 42 adet *Rattus norvegicus* (Wistar albino) soyu ağırlıkları ortalama 256.91 ± 2.99 g olan dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar eşit sayıda altı gruba ayrıldı. Kontrol olarak tutulan ilk üç gruptan I.gruba 0.3 ml serum fizyolojik (SF), II.gruba 0.3 ml ekstreyi çözüldürdüğümüz sıvı yağ, III. gruba 0.3 ml dimethyl sulphoxide (DMSO), deney grubu olarak, IV.gruba 2 mg/kg AfB1, V.gruba 4 mg/kg *A.densiflora* kök ekstresi, VI.gruba ise 2 mg/kg AfB1 ve 4 mg/kg *A.densiflora* kök ekstresi birlikte tek doz halinde intraperitoneal (i.p) olarak verildi.

Çalışma sonunda V.grupta, kontrol gruplarında olduğu gibi önemli düzeyde kromatid tipi kırığa rastlanılmadı. IV. ve VI. grupta ise önemli düzeyde kromatid tipi kırık gözlemlendi. Böylece *A.densiflora* kök ekstresinin kromatid tipi kırık yapmadığı fakat AfB1 ile birlikte verildiğinde ise AfB1'in neden olduğu kırık oluşumunu engelleyemediği tespit edildi. Lenfosit yüzdeleri kontrol gruplarına göre V.grupta önemli düzeyde artarken, nötrofil yüzdesinin V. ve VI. gruplarda düştüğü görüldü. Hematokrit değerleri ve monosit yüzdeleri ise gruplar arasında önemli bir farklılık göstermedi.

Sonuç olarak, toksik etkisi yanında antikanserojen etkisi olduğu bilinen *A.densiflora* kök ekstresinin 4 mg/kg dozunun tek başına kromatid tipi kırık yapmadığı ancak AfB1'in neden olduğu kromatid tipi kırıkları da önleyemediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Arnebia Densiflora*, Aflatoksin B1, Kromozom, Lökosit, Sıçan.

EFFECT OF *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. ROOT EXTRACT ON AFLATOXIN B1-INDUCED CHROMOSOME BREAKAGE IN RATS**ABSTRACT**

In this study, the effect of *Arnebia densiflora* root extract was investigated on aflatoxin B1(AfB1) induced chromosome breakage and leucocyte types in rats.

Forty-two *Rattus norvegicus* (Wistar albino) female rats, which have average weights 256.91 ± 2.99 g, were used in the study. The rats were divided into six groups in equal numbers. Group one received 0.3 ml serum physiological, group two received 0.3 ml liquid oil that is used to as a solvent for extract, group three received 0.3 ml dimethyl sulphoxide (DMSO) that is used as a solvent for AfB1. All of these groups evaluated as a controls. As an experimental groups, group four received 2 ml/kg AfB1, group five 4 mg/ kg *A.densiflora* root extract and group six received at the same doses AfB1 plus *A.densiflora* root extract. All groups were introduced a single dose intraperitoneal injection (i.p).

According to the data obtained, the chromatid type breakage in the group five was not statistically significant as compared with the control groups. Chromatid type breakage was statistically significant in the group four and six. Thus, we have determined that *A.densiflora* root extract does not cause chromatid type breakage, but when *A.densiflora* root extract given with AfB1, it was not prevented chromosome type breakage which is induced by AfB1. Haematocrite and monocyte percentages have not different among the groups but Lymphocyte percentages in the group five have significantly increased. Neutrophil percentages in the group five and six showed a significantly decrease when compared with controls.

As a result, *Arnebia densiflora* root extract has an anticancer effect besides toxic effect. It could not make chromatid type breakage at 4 mg/kg dose. In addition to this, we determined that it did not prevent chromatid type breakage induced AfB1.

Keywords: *A.Densiflora*, Aflatoxin B1, Chromosome, Leucocyte, Rat.

1. GİRİŞ

Naftakinonlar, bitki köklerinin özellikle kabuk kısımlarında bol olarak bulunurlar. Naftakinon türevlerinin hepsi renkli maddelerdir ve naftakinon türevi taşıyan bitkiler boya maddesi olarak asırlardır kullanılmaktadır. Bu türevler, *Alkanna tinctoria*'nın köklerinden izole edilen alkanninden dolayı alkanninler adı ile de bilinmektedir. Naftakinonlara bitkiler aleminde 150 türde rastlanılmaktadır. Bunların çoğu Boraginaceae familyasına ait *Echium*,

Onosma, *Alkanna*, *Cynoglossum*, *Lithospermum* ve *Arnebia* cinsine ait türlerdir [1-3].

A.densiflora, Boraginaceae familyasının *Arnebia* Forssk cinsine dahil bir türdür [Resim 1][1]. Boraginaceae köklerinden elde edilen ürünler birçok ülkede halk arasında ekzema, keratoderma, dermatophytosis, cons callus, acne vulgaris, yanıklar ve tüm hemoroidlerde kullanılmıştır [3]. Bundan hareket edilerek yüksek biyolojik aktiviteleri nedeniyle naftakinonlar antitümör [4-9], antibakteriyel [3,7,8,10,11], antifungal [12-15], antiinflammatuar [8] ve yara iyileştirici [2,3,13] olarak değişik araştırmalarda kullanılmıştır. Fakat bu bitkinin aynı zamanda doza bağlı olarak toksik etki gösterdiği yapılan bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur [6,14]. Bütün bu etkilerinden dolayı Boraginaceae familyası üyelerinin farmakolojik özellikleri üzerine çalışmalar halen sürdürülmektedir.

Çalışmamızda etkisini incelediğimiz ikinci madde mikotoksinlerin önemli gruplarından biri olan aflatoksinlerdir. Aflatoksinler *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* fungusları tarafından ikincil metabolit olarak üretilmektedir. Aflatoksinlerin hepsi toksik olup toksisite şiddeti B1>B2>G1>G2 şeklindedir [16-20,28-30]. Aflatoksinlerle yapılan çalışmalarda bunların mutajenik etkiye sahip oldukları ve kromozomlarda kromatid tipi kırıklara sebep oldukları saptanmıştır [21]. Aflatoksinler bilinen en önemli doğal kanserojenlerdir. Aflatoksinli gıdalarla beslenen kişilerde özellikle karaciğer kanserine yakalanma riskinin arttığı gösterilmiştir [22-24]. Aflatoksinlerin eritrosit ve lökosit miktarını doza bağlı olarak azalttığı bildirilmiştir [25-27].

Bu çalışmada *A.densiflora* kök ekstresinin antitümöral, AfB1'in ise kanserojen etkileri göz önüne alınarak, kromozom ve lökosit tipleri üzerine olan bozucu etkilerini *A.densiflora* kök ekstresinin düzeltip düzeltemeyeceğini araştırmak üzere planlandı.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada. 42 adet *Rattus norvegicus* (Wistar albino) soyu ortalama 256.91±2.99 g dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, *ad-libidum* beslendi ve her gün taze çeşme suyu verildi. Her grupta 7 hayvan olacak şekilde 6 grup oluşturuldu. Tüm gruplara yapılan uygulamalar **Tablo 1**'de belirtilen şekilde yapıldı. Tüm araştırma materyalleri tek doz halinde intraperitoneal (i.p) olarak hayvanlara verildi.

Enjeksiyonu takip eden 18. saat sonunda hayvanlar eter anestezisi altında bayıltılarak, karın göğüs bölgesi açılan her bir sıçanın kalbinin sol ventrikülünden enjektörle alınan kan örneklerinin hematokriti (Nüve NT 715) tayin edildi. Lökosit sayımı içinde yayma preparatlar yapıldı. Bunun için yayma yapılan preparatlar metanol (%100) gezdirilerek tespit edildi. Distile suda yıkandı. Giemsa (1 ml Giemsa stok+9 ml distile su) ile boyandı. Boyanan preparatlar çeşme suyundan geçirildi ve oda ısısında kurutuldu. Hazırlanan preparatlar mikroskopta değerlendirilerek, lökosit yüzdeleri belirlendi.

Kemik iliğinden kromozomlar elde edildi. Bunun için, sıçanlara enjeksiyonu takip eden 16. saatte mitoz bölünme durumundaki hücrelerin metafaz evresinde durmasını sağlayan 4 mg/kg colcemid i.p olarak verildi. İki saat sonra eter anestezisi altında bayıltılmış sıçanların tibia ve pelvisi kesilerek femur kemikleri açığa çıkarıldı. Femurun proksimal ucu, kemik iliği görülebilecek şekilde kesildi. Fetal Bovine Serum (37°C), örnek sayısı kadar enjektöre 3 ml çekildi ve bu enjektör ucu kemik iliği kanalına sokularak mümkün olan tüm kemik iliği çekildi. Kromozomlar sayılarının çokluğu, hücrelerin küçüklüğü nedeni ile oldukça sıkışık durumdadırlar. Hücre içi kromozomları daha iyi görünür duruma getirmek için hücre hipotonik solüsyonlarla şişirilmekte ve kromozomların daha büyük bir düzlemde dağılımları sağlanmaktadır. Bu amaçla kemik iliği+Fetal Bovine Serum karışımı 10 ml santrifüj tüplerine aktarıldı ve 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj (Nüve) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Kalan hücre peletine 5 ml 0.075 M KCl damla damla vorteks'de ilave edildi ve 20 dakika 37°C etüvde (Nüve EN 400) bekletildi. Süre sonunda 1200 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Taze Carnoy fiksatif (3 hacim metanol, 1 hacim asetik asit) 5 ml damla damla vorteks'de ilave edildi. Tekrar belirtilen rpm'de santrifüj edilip süpernatant atıldı. Tekrar Carnoy fiksatif ilave edildi. Otuz dakika buzdolabında bekletildikten sonra santrifüj edildi üstte biriken süpernatant atıldı. Daha önce bir gece 5 hacim alkol, 5 hacim eter karışımında bekleyen lamlar temizlendi kurulandı. Distile su dolu kavanozda bir gece bekletildi. Bu lamlara her hayvandan 3 preperat olacak şekilde, steril bir pastör pipeti vasıtası ile hücre süspansiyonu 25-30 cm yükseklikten püskürtülerek yayıldı. Lamlar kurutulmaya bırakıldı. Kuruyan lamlara %5 Giemsa boyası uygulandı (pH=7). Xylolde bekletilen lamlar entellan ile kapatıldı. Belirtilen şekilde standart harvesting yöntemi uygulanarak kromozom preperatları elde edildi [31]. Bu preperatlardan kromatid tipi kırık sayısı karşılaştırılmak üzere her bir örnek için iki yüz metafaz plağı sayıldı. Kırık tespit edilen metafaz plağı sayısı belirlendi. Sonuçlar tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

Yapılan bu çalışma sonunda kontrol grubu olarak kabul ettiğimiz; serum fizyolojik verilen I.grup, *A.densiflora*'nın katı kök ekstresini çözüldürdüğümüz sıvı yağ verilen II.grup ve AfB1'i çözüldürdüğümüz DMSO verilen III. grup için ölçülen parametre değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Bu nedenle deney gruplarından elde edilen parametre değerlerinin karşılaştırılmasında kontrol değeri olarak I.grup göz önüne alındı.

Hematokrit ve lökosit tiplerinin kontrol ve deney gruplarına ait değerleri **Tablo 2**'de görülmektedir. Hematokrit değerleri istatistiksel olarak yapılan karşılaştırmada kontrol ve deney grupları arasında önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Lenfosit yüzde değerleri için IV. ve VI. grup kontrol ile karşılaştırıldığında önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Ancak V. grupta görülen artış kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı bulundu ($p<0.05$). Monosit yüzde değerleri istatistiksel olarak yapılan karşılaştırmada kontrole göre gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Nötrofil yüzde değerleri kontrole göre karşılaştırıldığında IV. ve VI. grupta önemli bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Ancak V. grupta görülen düşüş kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Kromozomları kromatid tipi kırık yönünden değerlendirdiğimiz bu çalışmada kontrol ve deney gruplarında kromatid tipi kırık görülen metafaz plağı sayısı ve yüzde değerleri **Tablo 3**'de görülmektedir. Kromatid tipi kırık görülen metafaz plağı yüzde değerleri I. grupta (kontrol) ile V. grup arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık gözlenmezken ($p>0.05$), IV.grup ile VI.grupta görülen kırık yüzdesindeki artış kontrol grubuna göre oldukça önemliydi ($p<0.05$) [**Şekil 1,2**].

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hematokrit ve lökosit tiplerine ait değerler **Tablo 2**'de görüldüğü gibidir. Kontrol ve deney grupları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Yapılan bir çalışmada AfB1'in farelerde doza bağlı olarak hematokrit düzeyini düşürdüğünü bildirmişlerdir [26]. AfB1 verilen IV.grupta kontrole göre lenfosit ve monosit yüzde değerleri biraz azalmış, nötrofil yüzdesi ise biraz artmıştır. Fakat bu azalma ve artma önemsizdir [32]. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada aflatoksin'in (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AfG1 tek doz) 6.saatte lenfosit ve monosit yüzdelerini azalttığını bildirilmektedir. Yine 0.145 mg/kg ve 0.7 mg/kg AfB1 2 hafta her gün verdikleri bir çalışmada bu süre sonunda sıçanlarda doza bağlı olarak hematokrit, lenfosit ve monosit

yüzdelerinin azaldığını, nötrofil yüzdesinin ise arttığını bulmuşlardır. Bizim bulgularımızda aflatoksin'in bu etkilerini doğrulamaktadır. Ancak farklılık önemsiz de olsa lenfositlerdeki azalma ve nötrofil yüzdesinde görülen artış aflatoksin'in akut toksik etkisi olduğunu desteklemektedir. *A.densiflora* kök ekstresi verilen V.grupta lenfosit yüzde değerleri tüm gruplara nazaran önemli düzeyde artarken monosit ve nötrofil yüzde değerleri azalmıştır. Nötrofildeki azalma önemli bulunmuştur. Bütün bunlardan AfB1 ve *A.densiflora* kök ekstresinin verilen dozlarının toksik etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Daha önceki çalışmalarda da bildirildiği [19,21,33] gibi bizim çalışmamızda da AfB1 doza bağlı olarak önemli düzeyde kromatid tipi kırık oluşturmaktadır. Kontrol ve deney gruplarına ait kromatid tipi kırık yüzde değerleri tablo 3'de görüldüğü gibidir. AfB1 uyguladığımız grupta kontrol gruplarına göre kırık yüzde değerleri çok artmıştır. VI.grup değerleri de IV.grupla uygunluk göstermektedir. V. grupta ise *A.densiflora* kök ekstresinin 4 mg/kg dozunun kromatid tipi kırığa neden olmadığı ilaveten AfB1'in neden olduğu kromatid tipi kırıkları da önleyemediği görülmüştür.

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarına uygulanan madde uygulama dozu, süresi ve şekli

Gruplar	n	Uygulanan madde	Uygulama dozu, süresi ve şekli
Kontrol	I. grup	SF	0.3 ml tek doz (i.p)
	II. grup	Sıvı yağ	0.3 ml tek doz (i.p)
	III. grup	DMSO	0.3 ml tek doz (i.p)
Deney	IV. grup	AfB1	2mg/kg (DMSO/SF 1/3:V/V çözüldürüldü) tek doz (i.p)
	V. grup	A.densiflora	4 mg/kg (Sıvı yağda çözüldürüldü) tek doz (i.p)
	VI. grup	AfB1+A.densiflora	2 mg/kg+4 mg/kg tek doz (i.p)

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarının hematokrit ve lökosit tiplerinin yüzde değerleri ve istatistiksel değerlendirmeleri

Gruplar	n	Hematokrit %	LÖKOSİT TIPLERİ			
			Lenfosit %	Monosit %	Nötrofil %	
Kontrol	I.	7	50.43 ± 0.84	64.06 ± 3.16	4.44 ± 1.12	30.93 ± 2.42
	II.	7	49.43 ± 1.09	61.51 ± 2.85	4.70 ± 0.89	33.27 ± 2.63
	III.	7	48.29 ± 0.89	62.14 ± 2.64	3.56 ± 0.62	33.57 ± 2.66
Deney	IV.	7	53.14 ± 1.16	60.44 ± 3.28	3.33 ± 0.71	35.84 ± 3.10
	V.	7	51.57 ± 1.45	79.46 ± 2.20	2.60 ± 0.22	17.70 ± 2.13
	VI.	7	51.57 ± 1.19	66.56 ± 4.13	3.16 ± 0.86	27.21 ± 3.03

Gruplar	Hematokrit %	LÖKOSİT TİPLERİ		
		Lenfosit %	Monosit %	Nötrofil %
I-II.	n.s	n.s	n.s	n.s
I-III.	n.s	n.s	n.s	n.s
I-IV.	n.s	n.s	n.s	n.s
I-V.	n.s	*	n.s	*
I-VI.	n.s	n.s	n.s	n.s
IV-V.	n.s	*	n.s	*
IV-VI.	n.s	n.s	n.s	*
V-VI.	n.s	*	n.s	*

ns:p>0.05 Gruplar arası önemlilik yok *: p<0.05 Gruplar arası önemlilik var

Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarının karomatid tipi kırık görülen metafaz plağı oranları ve istatistiksel değerlendirmeleri

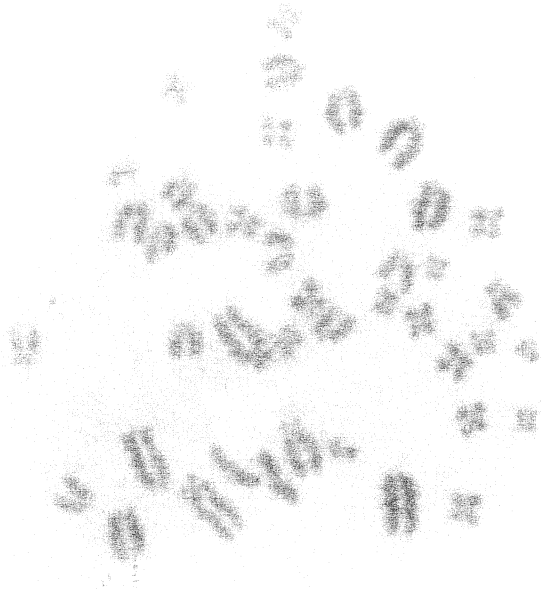
Gruplar		n	Kırık Görülen Metafaz Plağı Sayısı	Kırık Görülen Metafaz Plağı Yüzdesi (%)
Kontrol	I.	7	1.29 ± 0.36	0.64 ± 0.18
	II.	7	1.14 ± 0.26	0.57 ± 0.18
	III.	7	1.14 ± 0.40	0.57 ± 0.20
Deney	IV.	7	41.00 ± 3.12	20.50 ± 1.56
	V.	7	3.29 ± 1.36	1.64 ± 0.68
	VI.	7	47.00 ± 3.98	23.50 ± 1.99

Gruplar	Kırık Görülen Metafaz Plağı Sayısı	Kırık Görülen Metafaz Plağı Yüzdesi (%)
I-II.	n.s	n.s
I-III.	n.s	n.s
I-IV.	*	*
I-V.	n.s	n.s
I-VI.	*	*
IV-V.	*	*
IV-VI.	n.s	n.s
V-VI.	*	*

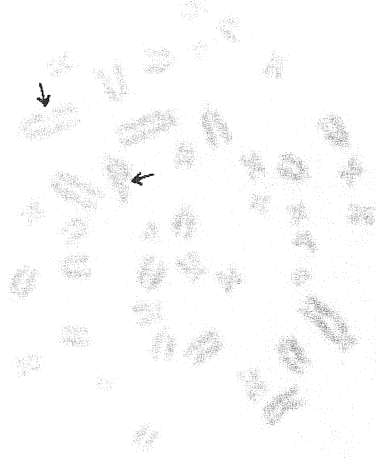
ns:p>0.05 Gruplar arası önemlilik yok *:p<0.05 Gruplar arası önemlilik var.



Resim 1. *Arnebia densiflora*



Şekil 1. Kontrol grubu metafaz plağı



Şekil 2. IV.Grupta kromatid tipi kırık görülen metafaz plağı (→ kromatid tipi kırık)

KAYNAKLAR

1. Baytop, A.: Farmasötik Botanik. İstanbul Üniv. Yay. No: 3637, İstanbul, (1991).
2. Kırimer, N., Cingi, M.İ., Alpan, S., Gez, S., Bozan, B., Başer, K.H.C.: *Arnebia densiflora*'nın toksisite ve farmakolojik etki yönünden araştırılması. IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, 110-114, 16-19 Mayıs (1991).
3. Papageorgiou, V.P.: Naturally occurring. Isohexenylnaphthazarin pigments: A new class of drugs. *Plant Medica*, 38(3): 193-203,(1980).
4. Kati, S.B, Shukla, Y.N, Tandon, J.S.: Arnebin derivatives for anticancer activity. *Indian Journal of Chemistry*, 18B: 440-442, (1979).
5. Sankawa, U., Otsuka, H., Kataoka, Y., Itaka, Y., Hoshi, A., Kuretani, K.: Antitumor activity of shikonin, alkannin and their derivatives. II. X-ray analysis of cyclo-alkannin leucoacetate, tautomerism of alkannin and cyclo-alkannin and antitumor activity of alkannin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 29(1): 116-122, (1981).
6. Sankawa, U., Ebzuka, Y., Miyazaki, T., Isomura, Y., Otsuka, H., Shibata, S., Inomata, M., Fukuoka, F.: Antitumor activity of shikonin and its derivatives. *Chem.Pharm.Bull.* 25(9): 2392-2395, (1977).
7. Shukla Y.N., Tandon J.S., Bhakuni D.S., Dhar M.M.: Naphthaquinones of *Arnebia nobilis*. *Phytochemistry*. 10: 1909-1915, (1971).
8. Tanaka, S., Tajima, M., Tsukada, M., Tabata, M.: A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin. *J.Natural products*. 49(3): 466-469, (1986).

9. Wahab, S., Tandon, R.N., Jacob, Z., Chandra, B., Srivastava, O.P.: Comparative in vitro and in vivo effect of lactones and arnebines on Trichophyton mentagrophytes and *Candida albicans*. Indian J. Med. Res. 76: 77-82, (1982).
10. Papageorgiou, V.P., Mellidis, A.S., Sagredos, A.N.: Study on the antibiotic fraction of *Alkanna tinctoria* Tausch. Chimica Chronica. New Series. 9: 57-63, (1980).
11. Papageorgiou, V.P., Winkler, A., Sagredos, A.N., Digenis, G.A.: Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of naphthaquinones and other constituents of *Alkanna tinctoria*. Planta Medica. 35:56-60, (1979).
12. Afzal, M., Al-Origat, G.: Shikonin derivatives, part V. chemical investigations of *Arnebia decumbes*. Agric. Biol. Chem. 50(6): 1651-1652, (1986).
13. Papageorgiou, V.P.: Wound healing properties of naphthaquinone pigments from *Alkanna tinctoria*. Experientia, 34(11): 1499-1501, (1978).
14. Wassel, G., El-Menshawi, B., Saeed, A., Mahran, G., El-Merzabani, M.: screening of selected plants for pyrrolizidine alkaloids and antitumor activity. Pharmazie, 42, (1987).
15. Wehner, F.C., Thiel, P.G., Van Rensburg, S.J., Demasius, I.P.C.: Mutagenicity to Salmonella typhimurium of some Aspergillus and Penicillium mycotoxins. Mutat. Res, 58, 193-203, (1978).
16. Başaran, A., Başaran, N., Erdem, S., Çakmak, E.A.: Eskişehir'de sütlerde aflatoksin B1 ve M1 aranması. Anadolu Tıp derg. 8, 61-69, (1986).
17. Başaran, A., Güneş, H.V., Eren, O., Çakmak, E.A., Kalkandelen G., Şimşek S., Değirmenci İ.: Uzun süre düşük dozda kullanılan aflatoksin B2'nin gelişmekte olan sıçanlar üzerine etkileri. X. Ulusal Biyoloji Kongresi, Bildiri Kitabı. I ,Erzurum, 303-313, (1990).
18. Başaran, A., Çakmak, E.A., Değirmenci, İ., Güneş, H.V.: The effects of aflatoksin B1 and Ecballium elaterium on serum enzyme levels and some urine excreta in rats. Fitoterapia, LXIII(6), 493-496, (1992).
19. Harvey, R.B., Clark, D.E., Huff, W.E., Kubena, L.F., Corrier, D.E., Phillips T.D.: Suppression of serum iron-binding capacity and bone marrow cellularity in pigs fed aflatoxin. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40, 576-583, (1988).
20. Hendrichse, R.G.: Aflatoxins and child health in the tropics. Cronicle, 15, 138-156, (1985).
21. Başaran, A., Başaran, N., Can Başer, K.H., Artan, S., Çakmak, E.A., Kırimer N.: Chromosome aberrations induced by aflatoxin B1 in rat bone marrow cells in vivo and their suppression by Ecballium elaterium. Proceedings of the 8th International Congress of Human Genetics, Washington 6-11 October 1991, Am.J. Human Genetics. 49 (Supple-4): 238, (1991).
22. Autrup, H., Wakhisi, I., Vahakangas, K., Wasunna, A., Harris, C.C.: Detection of 8,9 dihydro (7-quanyl 9- hydroxyaflatoxin B1) in human urine. Environmental Health Perspectives, 62, 105-108, (1985).
23. Yadgırı, B., Reddy, V., Tulpule, P.G., Srikantia, S.G., Gopalan, C.: Aflatoxin and Indian childhood cirrhosis. Am. J. Clin. Nutr. 23, 94-98, (1970).
24. Zhu, J., Zhang L., Hu X., Xiao Y., Chen J., Xu Y., Fremy J., Chu F.S.: Correlation of dietary aflatoxin B1 levels with excretion of aflatoxin M1 in human urine. Cancer Res, 47, 1848-1852, (1987).

25. Çakmak, E.A., Başaran, A.: Değişik dozlardaki aflatoxin B1 ve G1'in idrarla atılımı, vücut ağırlığı ve lökosit yüzdeleri üzerine etkileri. *Anadolu Tıp derg.* 13(2), 11-26, (1991).
26. Reddy, R.V., Taylor, M.J., Sharma, R.P.: Studies of immune function of CD-1 mice exposed to aflatoxin B1. *Toxicology.* 43, 123-132, (1987).
27. Reddy, R.V., Sharma, R.P.: Effects of aflatoxin B1 on murine lymphocytic functions. *Toxicology,* 54, 31-44, (1989).
28. Detroy R.W., Lillhoj E.B., Ciegler A.: Aflatoxin and related compounds. *Microbial Toxins IV,* Academic Press, New York and London, 4-155, (1971).
29. El-Zawahri M.M., Morad M.M., Khishin A.F.: Mutagenic effect of aflatoxin G1 in comparison with B1. *J. Environ Pathol. Toxicol. Oncol,* 10(1-2), 45-51, (1990).
30. Newberne P.M., Butler W.H.: Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals. A Review, *Cancer Res,* 29, 236-250, (1969).
31. Başaran N.: Sitogenetik Laboratuvar El Kitabı. Eskişehir Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eskişehir, 38-40, (1987).
32. Metcalfe C.R., Chalk L., Chattaway M.M., Hare C.L., Richardson F.R., Slatter E.M.: Anatomy of the dicotyledons. Oxford at The Clarendon press. First Edition. Vol:II, 945-950, (1950).
33. Brownie C.F., Brownie C.: Preliminary study on serum enzyme changes in Long Evans rats given parenteral ochratoxin A, aflatoxin B1 and their combination. *Vet. Hum. Toxicol.,* 30(3) 211-214, (1988).

