



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜRKİYE' NİN ÇEŞİTLİ BÖLGELERİNDEN TOPLANAN
İNSAN İDRAR ÖRNEKLERİNDE OKRATOKSİN A (OTA)
VARLIĞININ VE DÜZEYLERİNİN İMMÜNOAFFİNİTE
KOLON -YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE ARAŞTIRILMASI**

Çiğdem AKDEMİR

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman KARAKAYA**

2008- ANKARA



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜRKİYE' NİN ÇEŞİTLİ BÖLGELERİNDEN TOPLANAN
İNSAN İDRAR ÖRNEKLERİNDE OKRATOKSİN A (OTA)
VARLIĞININ VE DÜZEYLERİNİN İMMÜNOAFFİNİTE
KOLON -YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE ARAŞTIRILMASI**

Çiğdem AKDEMİR

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA

**Bu tez. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Tarafından 105S412
(SBAG-3219) proje numarası ile desteklenmiştir**

2008- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04 /07/ 2008

Jüri Başkanı

Prof Dr. Mümtaz İŞCAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA

Ankara Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sinan SÜZEN

Ankara Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç Dr. Ahmet AYDIN

Gülhane Askeri Tıp Akademisi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	vii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	
1.1. Funguslar, Mikotoksinler ve Mikotoksikozis	1
1.2. Bazı Önemli Mikotoksin Türleri	3
1.2.1. Aflatoksinler	3
1.2.2. Patulin	4
1.2.3. Fusarium Toksinleri	4
1.2.4. Okratoksinler	5
1.3. Çeşitli Küf Türlerinde Okratoksin Oluşumu Üzerine Etki Eden Faktörler	9
1.4. OTA'nın Yapısı ve Özellikleri	12
1.5. OTA'nın Emilimi, Dağılımı, Metabolizması ve Atılımı (ADME)	13
1.5.1. Faz I Reaksiyonları	16
1.5.2. Faz II Reaksiyonları	18
1.5.3. Süte Salgılanması	19
1.6. OTA'nın Toksisitesi	20
1.6.1. Akut ve Kronik Toksisitesi	21
1.6.2. Hepatotoksisitesi	23
1.6.3. Nefrotoksisitesi	23
1.6.4. Genotoksisitesi	25
1.6.5. DNA-Katım Ürünü Oluşumu	25
1.6.6. Teratojenik Etkileri ve Gelişimsel Toksisitesi	27
1.7. OTA'nın Toksisitesi Üzerine Etki Eden Faktörler	29
1.8. Gıdalarda OTA'nın Bulunuşu	31
1.8.1. Gıda Maddelerinde OTA için Düzenleyici Konsantrasyon Limitleri	32
1.8.2. Türkiye'de Gıdalarda OTA Düzeyleri İlgili Çalışmalar	33
1.9. İdrarda OTA ile İlgili Yapılan Çalışmalar	36
1.10. Çalışmanın Amacı	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Deney Kurgusu	40
2.2. Analiz Yöntemleri	41
2.2.1. İdrar Örneklerinin OTA Yönünden Analiz Edilmesi	41

2.2.1.1. Cihaz ve Malzemeler	41
2.2.1.2. Reaktifler	41
2.2.1.3. İdrar Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması	42
2.2.1.4. İmmünoaffinite Kolon (IAK) Çalışma Prensibi	43
2.2.1.5. HPLC koşulları	43
2.2.2. Validasyon Çalışması	45
2.2.3. Numunelerin Toplanması ile İlgili Yapılan Çalışmalar	45
2.2.4. Toplanan İnsan İdrar Örneklerinin Kreatinin Analizleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar	46
2.2.4.1. Analiz Yöntemi	46
2.2.5. LC/MS ile Doğrulama	47
2.2.5.1. Analiz Yöntemi	47
2.2.5.2. LC/MS koşulları	48
2.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	48
3.BULGULAR	
3.1. Yöntem Validasyonu Çalışmasına Ait Bulgular	49
3.1.1. Doğrusallık (Linearity)	49
3.1.2. Seçicilik (Selectivity)	51
3.1.3. Tanımlama Ve Ölçüm (Rapor) Limiti (LOD ve LOQ)	53
3.1.4. Kesinlik (Precision)	53
3.1.5. Gerçeklik (Trueness)	55
3.2. Örneklerin Toplanması Sırasında Uygulanan Anket Sonuçlarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular	56
3.2.1. Katılımcı Yaş Dağılımı	56
3.2.2. Katılımcı Cinsiyet Dağılımı	57
3.2.3. Katılımcı Aylık Gelir Dağılımı	57
3.3. Spot İdrar Örneklerinde OTA Analizleri ile İlgili Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	58
3.4. Kreatinin Tayini ile İdrarda OTA hesaplanması	60
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	60
3.6. LC/MS ile Yapılan Doğrulama Çalışmasına Ait Bulgular	66
4. TARTIŞMA	
4.1. İdrar Örneklerinde OTA Tayini	71
4.2. Türkiye Populasyonunda OTA Alımının Değerlendirilmesi	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
ÖZET	78
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	80
EKLER	

EK-1: Anket Formu	88
EK-2: Gönüllü Bilgilendirme Formu	91
EK-3: İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzunun Araştırmacılar Tarafından Okunduğuna Dair Belge	94
EK-4: Aştırmaya Katılan Tüm Ünitelerin ve Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge	95
ÖZGEÇMİŞ	96

ÖNSÖZ

Gıda Güvenliği ve Kalitesi ile ilgili olarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğünde, sürdürmekte olduğum iş hayatımda mesleki anlamda bana çok büyük katkılarının olduğuna inandığım tüm doktora eğitimim boyunca, özellikle tez çalışmalarım sırasında edindiğim bilgi ve tecrübeleri Ankara Üniversitesine borçluyum. Türkiye’ de bazı bölgelerde okratoksin A’ya maruziyeti ortaya koyabilmek amacı ile yapılan bu çalışmanın çataldan çiftliğe gıda güvenliği alanında katkılarının olması temennisi ile;

En başta beni bugüne kadar yetiştiren ve doktora tezimi hazırlarken gerekli olanakları hiç çekinmeden sağlayan, çalışmalarım sırasında yaşadığım sorunları benimle paylaşan her zaman doğru yolu bulmada yardımcı olan, üstün bilgisini, dikkatini, engin hoş görüsünü ve tecrübesini bu çalışmaya katan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Asuman KARAKAYA’ ya

Bu proje sırasında her türlü yardımını benden esirgemeyen, tüm zor anlarımda yanımda olan, analitik cihazlardaki becerisini ve bilgisini benimle paylaşan Biyolog Alaattin BAŞARAN’ a, çalışmalarım sırasında, en zor anlarımda, yakın ilgisi ve samimiyetiyle bana destek olan, kreatinin analizleri ve istatistiksel çalışmalarda bilgi ve becerilerini çalışmaya katan Anabilim Dalımız Araştırma Görevlisi Uzm. Ecz. Özge CEMİLOĞLU ÜLKER’ e, numunelerin toplanması sırasında tüm içtenliği ile bana destek olan, validasyon çalışmalarım için bilgi ve becerilerini benimle paylaşan Dr. Şennur ÖZKAYA’ ya,

Lisansüstü eğitimim süresince bana her zaman yardımcı ve destek olan, başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN’ a ve Anabilim Dalımızın diğer tüm değerli Öğretim Üyelerine,

Tez çalışmam için gerekli olan idrar örneklerinin toplanması ve anketlerin uygulanmasını organize eden Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU’ na, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji A.B.D. Başkanı Prof. Dr. Türkan YURDUN’ a, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Öğretim Görevlisi Doç Dr. Ahmet AYDIN’ a Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji ABD. Araştırma Görevlisi Dr. İskender KAPLANOĞLU’ na

Ayrıca çalışmalarım sırasında, benden manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen tüm Anabilim Dalı asistanlarına,

Tez dönemim sırasında bana her türlü desteği sağlayan sevgili anneme, babama, kardeşlerim ve arkadaşlarıma teşekkürlerimle saygı ve sevgilerimi sunarım

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALARA	As Low As Reasonably Achievable
ANOVA	Varyans Testi (A nalysis O f V ariance)
BEN	B alkan E ndemik N efropatileri (B alkan E ndemic N ephropathy)
CAT	Polphenol catechin
CONTAM	Panel on contaminants in the food chain
COX	Siklooksijenaz (C yclooxygenas)
DAI	Diadzein
DAS	Diasetooksisirpenol
DON	Deoksinivalenol
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (E uropean F ood S afety A uthority)
ELISA	E nzyme- L inked I mmuno S orbent A ssay
FAO	Gıda Tarım Örgütü (F ood and A griculture O rganization)
GEN	Genistein
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (H igh P erformance L iquid C hromatography)
IAK	İmmünoaffinite Kolon (I mmuno a ffinity C olumn)
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü (I nternational A gency for R esearch on C ancer)
JECFA	(J oint F AO/ W HO E xpert C ommittee on F ood A dditives)
KIN	K aryomegalic I nterstitial N ephritis
LC/MS	Likit Kromatografi/Kütle/Kütle Spektrometresi (L iquid C hromatography / M ass S pectrometer)
LOX	Lipooksijenaz (L ipoxygenases)
MDA	Malondialdehit
OTA	O kratoksin A
OTB	O kratoksin B
OTC	O kratoksin C
PGHS	Prostaglandin sentaz (P rostaglandin H synthase)
Phe	Fenil alanin amino asidi (P henilalanine)
RSD	Rölatif Standart Sapma (R elative S tandard D eviation)
SCF	Gıda Bilimsel Komitesi (S cientific C ommittee on F ood)
SIR	Tekli İyon Kaydı (S ingle I on R ecording)
SOD	Süperoksitdismutaz
ST	Sülfotranferaz
TAGEM	T arımsal A raştırmalar G enel M üdürlüğü
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
Tyr	Trozin aminoasidi (T yrosine)
UGT	Üridin-difosfat g lukuronosiltransferaz
α-TOC	α-tocopherol
va	V ücut a ğırlığı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (W orld H ealth O rganization)

Şekiller

Şekil 1.1.	<i>Penicillium verrucosum</i>	6
Şekil 1.2.	<i>Aspergillus ochraceus</i>	6
Şekil 1.3.	<i>P. verrucosum</i> küfünün mikroskopik görünüşü	6
Şekil 1.4.	<i>A. ochraceus</i> küfünün mikroskopik görünüşü	6
Şekil 1.5.	OTA 'nın kimyasal yapısı	8
Şekil 1.6.	OTB' nin kimyasal yapısı	8
Şekil 1.7.	OTC' nin kimyasal yapısı	9
Şekil 1.8.	Okratoksin'nin metabolizması	16
Şekil.2.1.	IAK çalışma prensibi	43
Şekil 3.1.	OTA'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi	49
Şekil 3.2.	OTA eklenmiş idrar örneklerinde yapılan analizlerden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyonu gösteren grafik	51
Şekil 3.3.	İçerisinde OTA bulunmayan boş insan idrar örneği	52
Şekil 3.4.	1 ng/mL düzeyinde OTA eklenmiş idrar örneğinin HPLC' ye enjeksiyonundan elde edilen kromatogram	52
Şekil 3.5.	0.074 ng/mL düzeyinde doğal kontamine idrar örneğine ait kromatogram	52
Şekil 3.6.	Katılımcılara ait yaş dağılım grafiği	56
Şekil 3.7.	Katılımcılara ait cinsiyet dağılım grafiği	57
Şekil 3.8.	Katılımcılara ait aylık gelir dağılım grafiği	58
Şekil 3.9.	İl bazında ve toplam illere ait LOD ve üzerindeki düzeylerde OTA'ya rastlanan ve TEDB bireylerin sayıları	59
Şekil 3.10.	Türkiye genelinde toplanan idrar örneklerindeki OTA (ng/mL)konsantrasyon aralıkları	59
Şekil 3.11.	Ortalama idrar OTA düzeylerinin (ng OTA/g kreatinin) bölgeler arası farklılıklarının one-way ANOVA yöntemi ile analizi	65
Şekil 3.12.	OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Continium Mode	66
Şekil 3.13.	OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Continium Mode zoomlanmış spektrum	66
Şekil 3.14.	OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Centroid Mode	68
Şekil 3.15.	OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Centroid Mode	67
Şekil 3.16.	Altı farklı düzeyde hazırlanmış olan OTA standartlarında elde edilen spektrumlar	68
Şekil 3.17.	OTA'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi	69
Şekil 3.18.	20 ng/mL düzeyinde OTA standardına ait S/N oranı	70

Şekil 3.19. OTA bakımından 0,075 ng/mL düzeyinde doğal kontamine insan idrar örneğine ait spektrum

Çizelgeler

Çizelge 1.1. Pirinç ve buğday kepeğinde sıcaklık ve İnkübasyon süresinin OTA üretimi üzerine etkisi	10
Çizelge 1.2. 4 ⁰ C ta çeşitli ürünlerde OTA üretimi	10
Çizelge 1.3. 28 ⁰ C ta inkübe edilen pirinçlerde OTB ve dehidroksikumarin Üretimi	11
Çizelge 1.4. OTA'nın yemlerden Dokulara Transmisyonu	14
Çizelge 1.5. OTA'nın Eliminasyonu İçin Yarı Ömrü	14
Çizelge 1.6. OTA'nın Biyotransformasyonunda Görev Alan CYP450 ile İlgili Literatürde Yer Alan Veriler	18
Çizelge 1.7. OTA'nın çeşitli türlerdeki LD ₅₀ değerleri	21
Çizelge 1.8. OTA'nın çeşitli hayvan türlerindeki nefrotoksisite ve karsinojenitesiyle ilgili LOEL ve NOEL değerleri	22
Çizelge 1.9. Gıda Maddelerinde OTA için Konsantrasyon Limitleri	33
Çizelge 1.10. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan hububat ve ürünlerinde OTA'ya rastlanma durumları	35
Çizelge 3.1. OTA eklenmiş idrar örneklerinde yapılan analizlerden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyon bulguları	50
Çizelge 3.2. Tanımlama ve ölçüm limiti çalışmasına ait elde edilen değerler	53
Çizelge 3.3. Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait elde edilen değerler	54
Çizelge 3.4. EC 401/2006 direktifine göre OTA için kabul edilebilir RSDr değerleri	54
Çizelge 3.5. Gerçeklik çalışmasına ait elde edilen değerler	55
Çizelge 3.6. EC 401/2006 direktifine göre OTA için kabul edilebilir geri alma oranları (%)	56
Çizelge 3.7. Bölgeler arası ortalama idrar OTA düzeyleri (ng OTA/g kreatinin)	60
Çizelge 3.8. Ankara bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi	61
Çizelge 3.9. Diyarbakır bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi	62
Çizelge 3.10. İstanbul bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi	63
Çizelge 3.11. İzmir bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi	64
Çizelge 3.12. Elde edilen ng OTA/gr kreatinin miktarlarının etki edebilecek (confounding) faktörler ile çoklu korelasyonu	65
Çizelge 4.1. Şehirlere göre idrar örneklerindeki OTA içeriği	74

1. GİRİŞ

1.1. Funguslar, Mikotoksinler ve Mikotoksikozis

Funguslar doğada toprak, su, hava ve organik kalıntılar üzerinde yaygın olarak bulunan heterotrofik organotrof mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaları, yüksek bitkilerden ve alglerden ayıran en belirgin özellik klorofil içermemeleridir. Saprotik veya parazitik olabilirler. Bakterilere kıyasla daha kompleks bir hücre yapısına sahiptirler ve bakteri hücrelerinden daha büyüktürler. Çok fazla sayıda canlıyı içeren funguslar hücre büyüklüğü, yapı ve metabolik aktiviteleri yönünden önemli farklılıklar gösterirler. Bazıları birbiri ile temasta olmayan tekli hücreler şeklinde bir gelişme gösterirken (mayalar), diğerleri hücrelerin birbiri ile temas halinde kalması sonucu hifsel gelişme ve filamentöz yapı gösterirler (küfler ve şapkalı mantarlar). Hiflerin oluşturduğu filamental kitleye miselyum adı verilir. Protista alemi içerisinde funguslar Mycota (fungi) bölümü olarak adlandırılırlar. Mycota bölümü altında ise iki alt bölüm mevcuttur. Bunlardan birincisi ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli fungusları içeren alt bölüm Eumycotina (Eumycetes veya true fungi), ikincisi ise Myxomycotina (slime fungi) dir (Ünlütürk ve ark., 1998).

Gıda kaynaklı funguslar, yararlı ve zararlı olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Örneğin asit ve enzimler gibi bazı fungal metabolitler, süt ürünleri, fırıncılık ürünleri ve fermente ürünlerin üretiminde kullanılırken, fungusların kendileri de direk olarak protein kaynağı olabilmektedir. Tarımsal ürünlerin ve gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasındaki fungal kontaminasyon ise, özellikle toksik metabolitlerin üretimi nedeniyle ilgi kaynağı olmaktadır (Samson ve ark. 1984).

1928'de bir küf türü olan *Penicillium chrysogenum* tarafından üretilen penisilinin keşfi; 1940'larda onun bir kemoterapötik ajan olarak tanınması ve

bu amaçla büyük ölçekte üretimi; insanlık tarihinde önemli bir dönüm noktası olmuştur. Penisilinin kullanımı; insan ölümlerinde önemli bir azalış sağlamış ve bu başarı başka antibiyotiklerin de araştırılmasına ve patulin, sitrinin, griseofulvin ve penisillik asidin keşfine yol açmıştır. Ancak bir süre sonra bu küf metabolitlerinin çoğunun antibakteriyel potansiyellerine rağmen, toksik özellikleri nedeniyle ilaç olarak kullanmak için uygun olmadıkları da anlaşılmıştır (Ünlütürk ve ark. 1998).

1960'larda ise Batı dünyası mikrofunguslar tarafından üretilen toksik metabolitlerden haberdar olmuştur. Binlerce hindi ve alabalığın ölümü, yemlerindeki yerfıstığı ve pamuk tohumu küspesinde bulunan *Aspergillus flavus*, aflatoksinlerin keşfedilmesine yol açmış, ardından okratoksin, islanditoksin, sitreoviridin ve luteoskirin, siklopiazonik asit ve sikloklorotin bulunmuştur. Toksik antibiyotikler; patulin, sitrinin ve penisillik asit listeye eklenmiş (Pitt, 1979) ve bu toksik maddeler için fungus anlamına gelen "myco" ile "toxin" kelimelerinden "mikotoksin" terimi türetilmiştir. Fungusların ikincil metabolizmaları sonucu sentezlenen mikotoksinler, yüksek canlılarda toksik etkiler göstermekte ve neden oldukları bu toksik sendromlar, genel olarak "mikotoksikozis" olarak adlandırılmaktadır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar, farklı mikotoksinlerin farklı organları etkilediğini ve akut toksik, mutajenik, karsinojenik, teratojenik, emetik, östrojenik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Betina 1989, Özkaya 2003).

Bilinen en eski mikotoksikozis olayı *Claviceps purpurea* tarafından oluşturulan ergotizmdir. Okratoksin A (OTA), Balkan ülkelerinde yaygın görülen "Balkan endemik nefropatisi" hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. *Fusarium* cinsi funguslar tarafından üretilen trikotesenler, Alimentary Toxic Aleukia (ATA) ve staçibotrikozis gibi hastalıkların nedeni olarak görülmektedir. Fumonisinlerin de yemek borusu kanserine neden olduğu ileri sürülmektedir. Aflatoksinlerin insanlarda karaciğer kanseriyle ilişkili olduğu, hayvan denemelerinde, epidemiyolojik ve moleküler genetik çalışmalarla görülmüştür (Samson ve ark. 1984).

Aflatoksinlerin keşfiyle birlikte başlayan çalışmalar ile günümüze kadar mikotoksinler konusunda önemli gelişmeler kaydedilmiş ve büyük bir bilgi birikimi sağlanmış olmasına karşın, mikotoksinler “gıda güvenliği” için hala en önemli tehditlerden biri olmaya devam etmektedir. Özellikle hasat öncesi enfeksiyonu tamamen engellemek mümkün olmadığı için, mikotoksinlerin gıdalarda oluşumunun tamamen önlenemezliğinden daha çok, azaltılabilmesi üzerinde durulmaktadır. Mikotoksinlerin oluşumu, sıcaklık, nem gibi çevre faktörlerinden etkilendiği ve coğrafik bölge, tarımsal uygulamalar ve ürünün hasat öncesi ve/veya sonrasında fungal enfeksiyona duyarlılığına bağlı olarak değiştiğinden, kontaminasyonun boyutunu önceden bilebilmek pek mümkün olamamaktadır (Özkaya, 2005) .

Fungusların gelişimi ve toksin oluşturabilmesi için en önemli faktörler, sıcaklık ve ürünün su aktivitesidir. Funguslar genel olarak diğer mikroorganizmalara göre daha düşük su aktivitesinde gelişebilmektedirler ve pratikte 0,70 su aktivitesi (a_w) fungal gelişimin önlenmesi için sınır olarak kabul edilmektedir. Toksin oluşumu için ihtiyaç duyulan su aktivitesi, fungus gelişimi için ihtiyaç duyulandan biraz daha fazladır ve çok yüksek sıcaklıkların dışında, fungusun gelişmesine imkan veren her sıcaklık derecesinde, toksinin de oluştuğu belirtilmektedir (Pohland and Wood, 1987).

1.2 Bazı Önemli Mikotoksin Türleri

1.2.1 Aflatoksinler

İlk yıllarda kağıt kromatografisi ile yapılan çalışmalarda, bu toksik materyal tek bir komponent gibi algılanmış; daha sonra İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile yapılan çalışmalarda adı geçen toksinin 4 farklı bileşikten meydana geldiği ortaya çıkmıştır. Ultra viyole (UV) ışığı altında mavi floresans veren iki bileşen, aflatoksin B₁ (AFLB₁) ve aflatoksin B₂ (AFLB₂) olarak; sarı-yeşil floresans veren iki bileşen ise G₁ ve G₂ olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, aflatoksin ihtiva eden yemleri tüketen süt veren hayvanların sütlerinde bu

toksinlerin bir türevinin salgılandığı ortaya çıkmış ve sütte bulunmasından dolayı da buna “süt toksini” (milk toxin) anlamında aflatoksin M adı verilmiştir (Van Egmond 1994).

1.2.2. Patulin

Patulin ilk kez 1940 yılında izole edilmiştir şimdilerde tüm dünyada elma ve elma sularında geliştiği bilinmektedir. Bu mikotoksin türü *Penicillium expansum* ve diğer *Penicillium* spp. gibi pek çok küf türü tarafından üretilmektedir. Elma ve armutta hasat sonrası gelişen patojen küflerdir. Bu küfler tarafından çürütülen meyveler aynı zamanda patulin ile kontamine olurlar. Patulin ısısal işlemlere karşı dayanıklıdır. Kısa dönemli yapılan çalışmalar patulinin DNA ya da kromozom hasarı gibi genetik etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Ancak bu çalışmalar bakteri ya da memeli hücre kültürlerinde yapıldığı için insan maruziyeti ile ilgili değildir (Hopmans,1997).

1.2.3. Fusarium Toksinleri

Yaygın olarak toprakta bulunan *Fusarium* türleri, trikotosenler (T-2 toksin, HT-2 toksin, deoksinivalenol (DON) ve nivalenol) ve diğer bazı toksin gruplarını (zeralenon ve fumonisinler) içeren mikotoksinleri üreten küflerdir. *Fusarium* küfü muhtemelen Amerika, Avrupa ve Asya'nın soğuk iklimin hakim olduğu kuzey bölgelerinde en yaygın olarak bulunur. *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*(*F. cerealis*), *F. culmorum*, *F. poae* ve *F. acuminatum* gibi bazı *Fusarium* türleri tarafından üretilen önemli toksik metabolitlerdir. Trikotosenler, seskiterpenoid yapıda, birbirine benzer kimyasal bileşiklerden oluşmuştur. 150'ye yakın trikotosen türevinin yapısı bilim literatüründe tanımlanmıştır. Trikotosen çekirdeğinin kimyasal yapısına bağlı olarak, trikotosenler iki kategoride incelenir.

- **Tip A trikotosenler:** C8 de keton grubu içerenler

F. sporotrichioides, *F. acuminatum* ve *F. poae* tarafından üretilen T-2 toksin ve HT-2 toksin ve

F. poae, *F. equiseti*, *F. submicinum* ve *F. sporotrichioides* tarafından üretilen Diasetooksisirpenol (DAS)' dur.

- **Tip B trikotosenler:** C8 de yalnız bir karbonil grubu taşıyanlar

F. graminearum ve *F. culmorum* tarafından üretilen Deoksinivalenol (DON ya da diğer adıyla vomitoksin) ile bunun mono türevleri (3AcDON ve 15 AcDON) ve diasetil türevleri (3–15 AcDON) ve

F. graminearum, *F. crookwellense* ve *F. poae* tarafından üretilen nivalenol(NIV) fusarenon X (FX-4AcNIV) ve diasetil türevi 4,15-AcNIV'dir (SCF, 2002).

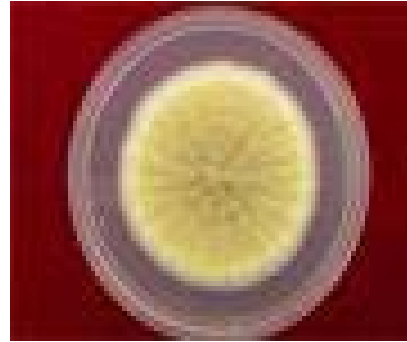
1.2.4. Okratoksinler

Okratoksinler ilk kez Merwe ve ark. (1965) tarafından *A. ochraceus* (Şekil 1.2, 1.4)'un ürettiği bir mikotoksin olarak Güney Afrika'da yonca tanelerinde K-804 suşundan izole edilmiş, daha sonra bu ve diğer suşların mısırdaki yetiştirdiklerinde okratoksin oluşturdukları gözlemlenmiştir. Merwe ve ark. (1965) tarafından A,B ve C olmak üzere 3 tip okratoksin tanımlamıştır. OTA, okratoksinler grubu içerisindeki en önemli ve tek toksikolojik öneme sahip olan mikotoksindir. Peptid bağı ile fenilalanine bağlanmış bir izokumarin yan dalı taşıyan 403 moleküler ağırlığa sahip bileşiktir (Merwe 1965, Marquardt ve Frohlich, 1992).

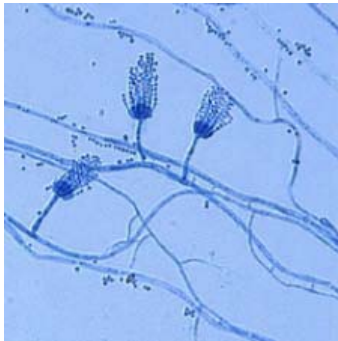
OTA genellikle hububat, yağlı tohumlar, yeşil kahve, şarap ve domuz eti gibi gıda ürünlerinde bulunabilir. Nefrotoksik ve nefrokarsinojenik olan OTA (L-fenilalanin-N-[(5-kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metil-1-okso-1H-2-benzopiridin-7-yl)karbonil]-(R)-izokumarin) *P. verrucosum* (Şekil 1.1, 1.3) ve *P. nordicum* tarafından soğuk iklim koşullarında ve pek çok *Aspergillus* türü tarafından ise daha ılık ve tropik iklim koşullarında üretilen bir mikotoksindir (Ringot ve ark. 2006). Ancak son zamanlarda Varga ve ark.(1996) tarafından *A. albertensis*, *A. auricomus* ve *A. wentii* gibi üç *Aspergillus* türünün de okratoksijenik olduğu rapor edilmiştir. Genelde ürünün kurutulması sırasındaki kötü depolama koşulları ya da kötü tarımsal uygulamaların sonucunda bu küflere rastlanmaktadır (Moss 1996). Ayrıca Bayman ve ark. (2001) yapmış oldukları bir çalışmada, çok az tanınan bir *Aspergillus* türü olan *A. alliaceus* 'un Kaliforniya'da görülen küfler arasında önemli bir OTA üreten küf olduğunu ve incirlerde görülen OTA kontaminasyonunun nedeni olduğunu göstermişlerdir.



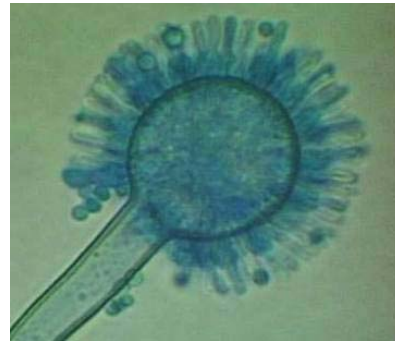
Şekil 1.1. *Penicillium verrucosum*



Şekil1.2. *Aspergillus ochraceus*



Şekil 1.3. *P. verrucosum* küfünün mikroskopik görünüşü

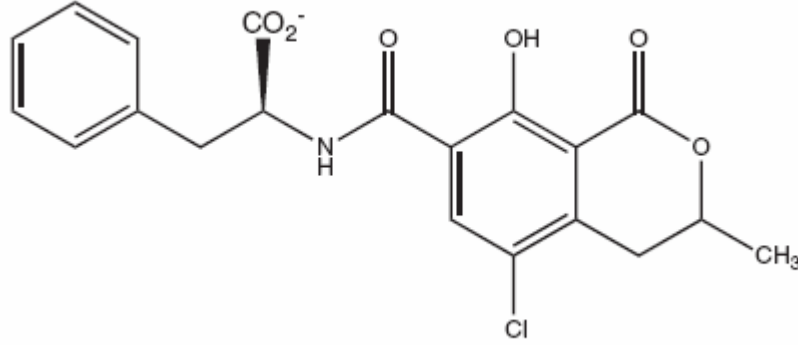


Şekil 1.4. *A. ochraceus* küfünün mikroskopik görünüşü

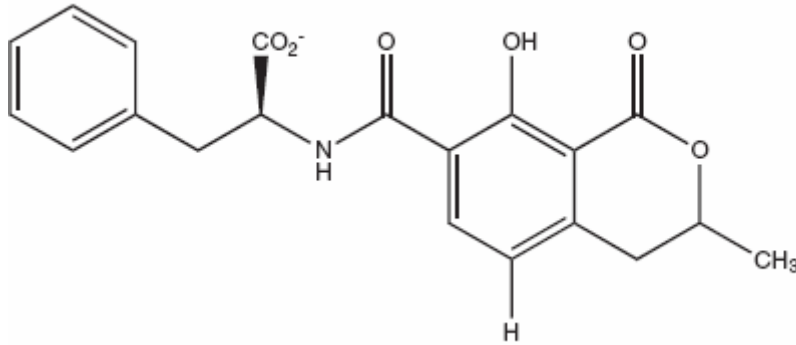
7 karboksi grubu üzerinden L-fenilalanine bir amid bağı ile bağlı dihidroksikumarin türevi olan OTB *A. ochraceus* tarafından üretilen sekonder bir metabolittir. OTA ile birlikte oluşabilir. Örneğin kuru ekmekte OTA ve OTB sırasıyla 80 ve 9,6 mg/kg olarak bulunabilirler. OTB yapısal olarak molekülün 5. pozisyonundaki klorun eksikliği nedeni ile OTA'dan ayrılır (Şekil 1.5, 1.6) (Stromer ve ark. 1985). Yapısal olarak OTA'ya çok benzer olmasına rağmen daha az toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir. Mally ve ark. (2005) OTB'nin sıçanlardaki biyotransformasyonunu, nefrotoksitesini ve sitotoksitesini araştırmak için yaptıkları bir çalışmada F344 erkek sıçanlara tek doz (10mg/kg (va) ya da tekrarlayan dozlarda (2 mg/kg va, 2 hafta süreyle 5 gün/hafta) OTB uygulamışlar ve son uygulamadan 72 saat sonra hayvanları ötenazi etmişlerdir. Tek yüksek doz OTB uygulanan hayvanların proksimal tüp hücrelerinde mitotik şekillerde hafif bir artış gözlemlenmiştir. Ancak tekrarlanan dozlarda yapılan uygulamaya bağlı olarak klinik kimya verilerinde, renal fonksiyonlarda ve histopatolojilerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Aynı çalışmada OTB'nin ve metabolitlerinin idrarla ve dışkıyla atılımı ile ilgili olarak hem floresan dedektörlü HPLC hem de LC/MS/MS ile yaptıkları çalışmada peptid bağının parçalanması ile oluşan okratoksin betanın idrardaki majör metabolit olduğunu ve bunun yanı sıra az miktarda 4-hidroksi-OTB'nin bulunduğunu gözlemlenmişlerdir. Tek doz uygulamadan 72 saat sonra idrar ve dışkıdan toplam miktarın % 19'unu OTB ve metaboliti olan okratoksin beta olarak geri kazanmışlardır. OTA'nın tersine OTB ile ilgili olarak herhangi bir dokuya özgü alıkonmaya rastlanmamıştır. OTB'nin OTA'ya göre daha hızlı metabolize olduğu rapor edilmiştir.

OTA'nın etil esteri olan OTC'ye (Şekil1.7) gıda ve hayvan yemlerinde doğal kontaminant olarak ender rastlanır. Ancak çok yüksek konsantrasyonda OTA içeren yemlerde OTC varlığına rastlanmaktadır. Galtier ve Alvinerie (1976) OTA'nın rumen sıvısında *invitro* olarak inkübasyonu sonucu OTC'ye dönüştüğünü göstermişlerdir. Böylece hayvansal orijinli gıdalarda kalıntı olarak bulunan OTC sanitasyon ve halk sağlığı problemlerine yol açabilmektedir (Fuchs ve ark. 1984).

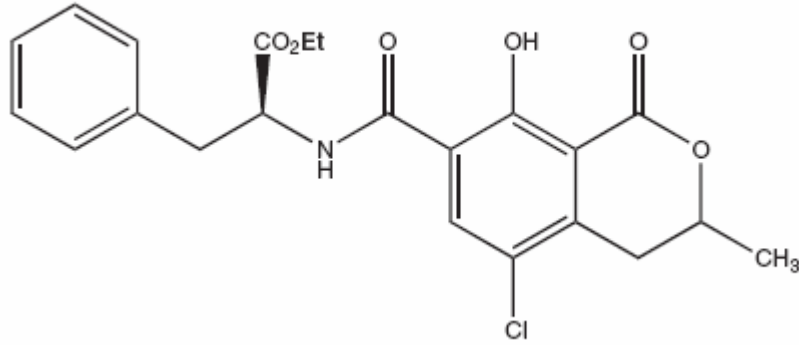
Toksinin dağılımını inceleyen araştırmalar *A. ochraceus*'un birincil olarak OTA ürettiğini, OTA ya göre daha az toksik özelliğe sahip olan OTB ve dihidroizokumarik asidi ise daha az ürettiğini ortaya koymuştur. OTA kadar toksik olan OTC'nin 28°C' ta pirinçlerde inkübasyonu ile yapılan çalışmalarda ise ortamdan izole edilemediğini göstermiştir (Trenk ve ark. 1971).



Şekil 1.5. OTA 'nın kimyasal yapısı



Şekil 1.6. OTB' nin kimyasal yapısı



Şekil 1.7. OTC' nin kimyasal yapısı

1.3 Çeşitli Küf Türlerinde Okratoksin Oluşumu Üzerine Etki Eden Faktörler

Sıcaklık, su aktivitesi(a_w), pH, substrat tipi, kompetitif mikroflora varlığı, küf suşu, tohumun bütünlüğü (parçalanma, zedelenme), gaz atmosferi(CO_2 ve O_2), koruyucu kullanımı gibi etkenler OTA üretimini etkiler (Marquardt ve Frohlich, 1992) .

Hesseltin ve ark. (1972) yapmış olduğu çalışmada *A. ochraceus* tarafından OTA üretimi için en uygun sıcaklığın aflatoksin üretimi için de benzer olan $28^\circ C$ olduğunu ortaya koymuşlardır. Ancak en büyük fark $15^\circ C$ 'de önemli miktarda OTA oluşumu gözlenirken $10-15^\circ C$ 'lik sıcaklık aralıklarında aflatoksin üretiminin oldukça az olmasıdır. $4^\circ C$ 'de ise okratoksinin oluşumu oldukça azdır. Bu gerçek, hububatların güvenli bir şekilde saklanması için soğuk koşulların önemini ortaya koymuştur. Bununla beraber 4 hafta boyunca $4^\circ C$ 'de inkübasyona bırakıldığında toksin üretimi çok düşük olsa bile çok uzun süreli bekletildiğinde toksin oluşumu gözlenmektedir. $37^\circ C$ 'de ise toksinin degradasyonun artması yada organizmanın bu sıcaklıklarda toksin üretmemesi nedeni ile toksin miktarı azalır.

Trenk ve ark. (1971) *A. ochraceus* NRRL-3174 ile yaptıkları çalışmada sıcaklık ve inkübasyon süresinin OTA üretiminin ürüne bağlı olarak değişimini izlemişlerdir. Yapılan çalışmada bu suşun toksin üretimi için ideal sıcaklığının 28 °C civarında olduğu bulunmuştur (Çizelge1.1). Mısır, pirinç ve ve buğday kepeğinde 4°C de toksin üretiminin çok düşük olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 1.2) OTB ve bir OTA hidroliz ürünü olan dihidrosikumarinin üretiminin OTA üretimine göre oldukça düşük olduğu (Çizelge 1.3) pirinçlerde ise 28 °C'ta OTA üretiminin olmadığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada toksin eklenmiş pirinç, hububat ya da yulaflar 3 saat süre ile otoklavlama yapılmasına rağmen oldukça stabil bir yapıya sahip olan toksinin parçalanmasının az olduğu gözlemlenmiştir. *A. ochraceus* küfü okratoksin üretimi bakımından *P. viridicatum*' a göre daha geniş sıcaklık aralığına sahiptir.

Çizelge 1.1. Pirinç ve buğday kepeğinde sıcaklık ve inkübasyon süresinin OTA üretimi üzerine etkisi

inkübasyon (günler)	OTA Üretimi Sıcaklıkları							
	15 °C		20 °C		28 °C		37 °C	
	PR	WB	PR	WB	PR	WB	PR	WB
3	0,03	0,06	0,01	0,19	0,45	0,37		
5	0,05	0,11	0,10	0,23	29,22	15,79	0,24	0,29
7	0,09	0,12	0,69	8,26	30,23	35,38		
9	0,09	0,10	11,69	11,13	40,48	38,15	15,10	0,38
12	0,54	0,49	14,27	11,08	53,13	44,11	1,33	0,13
14	2,00	1,05	12,09	11,00	39,24	44,39	2,16	0,24

Değerler 30 g substrattaki mg cinsinden OTA'yı temsil etmektedir. PR: polished rice (kabuksuz pirinç) WB: wheat brian (buğday kepeği)(Trenk ve ark. 1971)

Çizelge 1.2. 4°C'de çeşitli ürünlerde OTA üretimi (Trenk ve ark. 1971)

İnkübasyon (gün)	Okrotoksinin üretildiği matriks					
	Mısır		Pirinç		Buğday kepeği	
	µg*	µg*/g	µg*	µg*/g	µg*	µg*/g
21	2,67	0,09	0,094	0,03		
28	3,05	0,10	3,11	0,10	2,74	0,09

*Her bir balonda 30 g matrikste bulunan mikrogram değerler.

Çizelge 1.3. 28⁰C'de inkübe edilen pirinçlerde OTB ve dehidroksikumarin üretimi (Trenk ve ark. 1971)

İnkübasyon (gün)	Toksin konsantrasyonu (µg/g)	
	OTB	dihidroksikumarin
3	4,97	0,86
5	25,59	2,90
7	25,07	3,99
9	44,80	3,33
12	53,59	7,39
14	22,43	6,12
17	26,90	6,58

*Her bir balonda 20 g matriks bulunmaktadır.

Davis ve ark. (1969) yaptıkları başka bir çalışmada *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 suşunu farklı konsantrasyonlarda sükröz ve maya ekstraktı içeren besleyici ortamlarda gelişmeye bırakmış ve farklı besleyici ortamlarda üretilen OTA miktarlarını araştırmışlardır. En yüksek OTA üretiminin (29 mg/100mL) % 4 sükröz ve % 2 maya ekstraktı içeren ortamda olduğunu tespit etmişlerdir. Yüksek düzeyde OTA üretiminin % 4 sükröz ile % 32 maya ekstraktı içeriğine kadar artmadan devam ettiğini, ortam pH'sının da sükröz konsantrasyonu ile ters orantılı olarak değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışma sonucunda belirtilen besleyici ortamlarda yalnızca sükröz konsantrasyonu %8 veya daha yüksek olduğunda OTB'nin üretiminin söz konusu olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak *A. ochraceus* NRRL 3174 suşunun konvensiyonel besleyici kültür ortamlarında OTA üretmediğini ve ortam koşullarının OTA üretimi üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

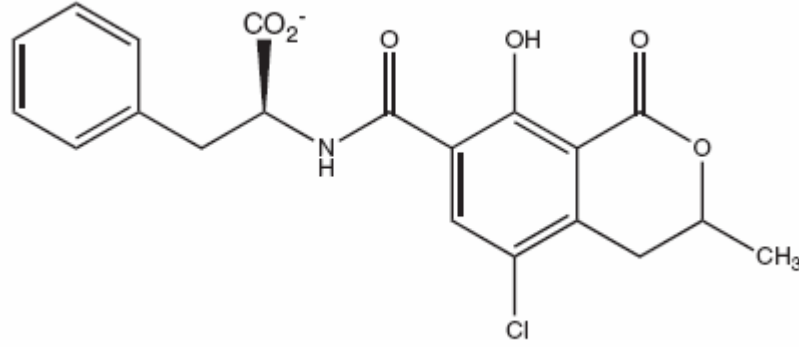
Yunanistan'da üzümelerde gelişen *A. carbonarius* küf tütünün gelişimi ve OTA üretimi üzerine nem ve sıcaklığın etkisinin incelenmesi üzerine bir çalışma yapılmış ve bu çalışmada su aktivitesi (a(w):0,85 den 0,98'e) ve sıcaklık (10 °C'den 40 °C'ye) değişimindeki gelişimleri incelenmiştir. Yunanistan'da yetiştirilen şaraplık üzümle buna benzer sentetik üzüm suları kullanılmış ve 55 gün boyunca veriler toplanmıştır. Maksimum OTA üretimi inkübasyonun 25. gününden sonra 20 °C'de, 0,96 a(w) su

aktivitesinde ve her iki ortamdan da izole edilen küf suşlarında sırasıyla 3,14 ve 2,67 µg/g olarak tespit edilmiştir. İzole edilen her iki küf suşunun da diğer Akdeniz havzasındakilerden daha kserotolerant (kuraklığa dayanıklı) olduğu tespit edilmiştir (Tassou ve ark. 2007).

1.4. OTA' nın Yapısı ve Özellikleri

Beyaz kristal toz şeklindedir. Ksilenden rekristalize olur ve ultraviyole ışığında mavi (alkali çözeltilerde) ve yeşil (asit çözeltilerde) fluoresans yayan kristal şeklinde yapılardır. Bu kristal yapının erime noktası 169°C dir. OTA'nın serbest asidi organik solventlerde, sodyum tuzları ise suda çözünür. Işık ve havaya karşı kararsız bir yapı gösterirler ve özellikle nemli koşullarda ışığa kısa bir süre maruz kalma ile bile parçalanır ve uçarlar. Etanol çözeltisi buzdolabında bir yıldan daha fazla süre ile bozulmadan saklanabilir. Isıya karşı az dayanıklıdır; 3 saate kadar otoklavlandıklarında yaklaşık % 65 'i parçalanır (NIESH 1991).

OTA orta derece stabil yapıya sahip bir moleküldür ve pek çok gıda prosesi sırasında belli bir dereceye kadar bozulmadan kalır ve tüketilmekte olan gıda ürünlerinde görülebilir. Kaynatma, fırınlama, kızartma ya da fermantasyon işlemleri sırasında pH ve sıcaklık gibi diğer bazı parametrelere bağlı olarak belli oranlarda yıkılabilir OTA pişirme ve ekmek yapımı sırasında kısmı olarak yıkımlanır. Fırınlama ve kızartma sırasında yaklaşık %20 oranında parçalanır. Bununla beraber buğday unu yapımı sırasında öğütülmeden önce kabuklarının ayıklanması gibi tanelerin fiziksel muameleye maruz kalması OTA'nın yaklaşık %50 oranında azalmasına neden olur. Öğütmenin OTA düzeyi üzerine etkisinin olmadığı ya da en az seviyede etkisinin olduğu görülmüştür (Risk Assessment Studies Report No:23 2006, Codex alimentarius commission,1998) .



Şekil1.5. OTA 'nın kimyasal yapısı

1.5. Emilimi, Dağılımı, Metabolizması ve Atılımı (ADME)

OTA özellikle ince bağırsak olmak üzere gastrointestinal sistemin üst kısmından emilir. Genel olarak emilimi domuzlarda % 60, sıçanlarda %56, tavşanlarda %56 ve tavuklarda % 40'tır ve kanda serum albumin ve diğer makromoleküllere bağlanır. Yalnızca % 0,02'si insan ve sıçanlarda bağlanmadan kalır. Domuzlarda, sıçanlarda, tavuklarda ve keçide dağılımı başlıca böbreklere olurken düşük konsantrasyonda ise karaciğer, kas ve yağ dokuda bulunur. sıçan ve domuzlarda plasentaya geçer ve sıçan, tavşan ve insanda sütte de bulunur. Kandan atılımı böbrek, karaciğer ve diğer dokulara oranla daha yavaş olur. Çizelge 1.4'de tavuk, inek ve domuzda yemlerle OTA verilmesinden sonra çeşitli doku ve organlarda OTA'nın dağılımı görülmektedir. Domuzlarda en yüksek kontaminasyona böbreklerde rastlanmaktadır. Bu oran kandaki düzeyin beş katı kadardır. Ruminantlarda ise mide ağzında bulunan bakteriler ve protozoalar ile hidrolize uğradığından dokularda çok düşük miktarlarda rastlanabilir (Pohland ve ark. 1992).

Ağız yoluyla alınımından sonra serum yarı-ömrü maymunda 510 saat, domuzda 72–120 saat, sıçanlarda 55–120 saat, farede 24–39 saat ve tavukta 4,1 saattir. İnsanlarda ise yarı-ömür yaklaşık 840 saattir (35 gün).

Çizelge 1.4. OTA'nın Yemlerden Dokulara Transmisyonu (Pohland ve ark.1992)

Tür	Yemdeki düzey (ng/g)	Doku	Kontaminasyon düzeyi(ng/g)
Brolier Tavuk	50-2000	Böbrek	0,8
		Karaciğer	11-59
		Kas	3,0-8,5
		Kan	1,2-4,6
İnek	1125	Böbrek	5
Domuz	25-1400	Böbrek	1,8-67
		Karaciğer	2,0-30
		Kas	ND-37
		Yağ	ND-11
		Kan	665

Bazı hayvan türlerinde intravenöz (i.v) oral yolla (p.o) ve 50 ng OTA/(va) düzeyinde OTA uygulamasından sonra $t_{1/2}$ (h) ölçülmüştür (Çizelge 1.5)

Çizelge 1.5. OTA'nın Eliminasyonu İçin Yarı Ömrü (Petzinger ve Zeigler 2000)

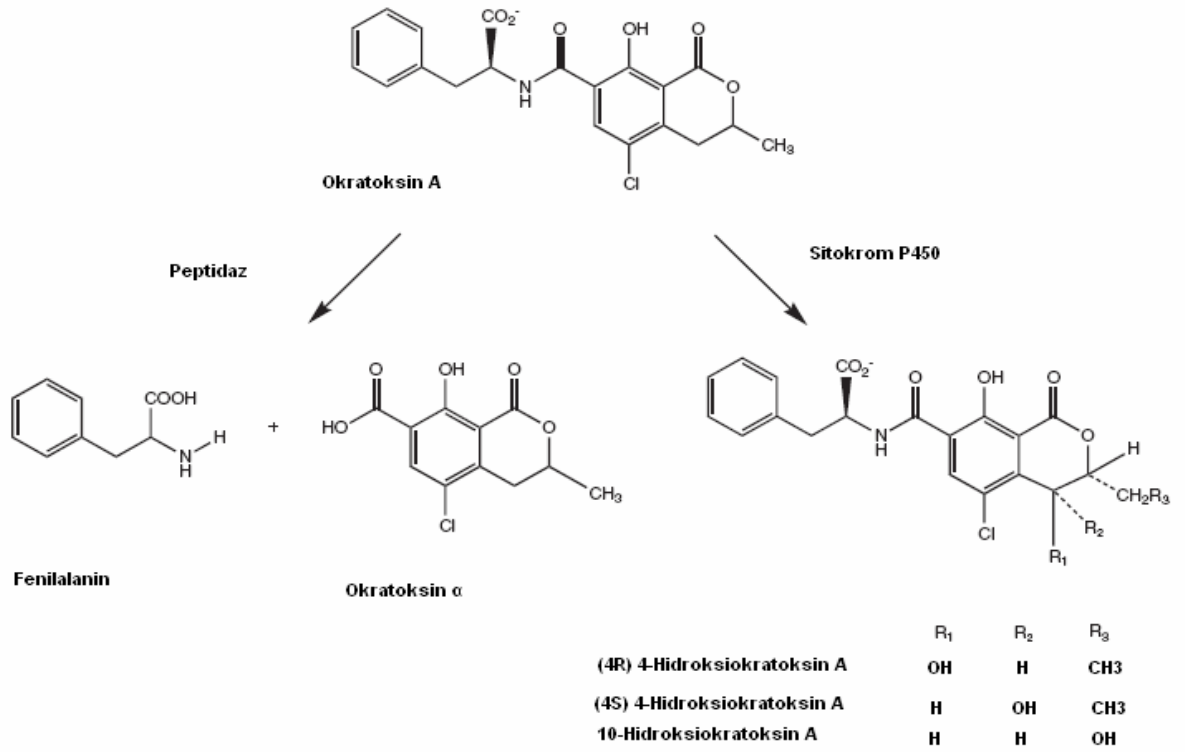
Eliminasyon yarı ömür $t_{1/2}$ (h)	Sazan	Bıldırcın	Fare	Domuz	Sıçan	Maymun Macaca	İnsan
i.v.	8,3	12	48	150	170	840	≈1400
p.o.	0,68	6,7	39	72	120	510	840

OTA safra ve idrarla atılır. İncelenen tüm türlerde OTA'nın başlıca bağırsaklardaki mikroflora sayesinde olmak üzere hidrolize olarak (detoksifiye) okratoksin α 'ya dönüştüğü görülmüştür (Şekil 1.8). Karaciğer ve böbreklerin hidrolize etme kapasitesi düşüktür. Ancak safraya atılan hidrolize olmuş OTA, bağırsaklardaki mikroflora tarafından yeniden emilir böylece enterohepatik sıklusa girmiş olur. İnsan, fare, sıçan ve domuzlarda yapılan *in vitro* çalışmalarda OTA'nın karaciğer mikrozomlarındaki sitokrom P450 ler tarafından 4-OH-okratoksin A'ya okside olduğu görülmüştür. Tüm metabolitlerinin OTA'nın kendisinden daha az toksik olduğu düşünülmektedir. Sıçanlara verilen radyoaktif olarak işaretlenmiş OTA'nın %33'ü dışkıda ve idrarda atılan en önemli metaboliti % 26 oranıyla okratoksin α 'dır. Daha sonra %6 OTA ve %1,5 4R-OH-okratoksin A'dır (Walker ve Larsen 2005).

Erkek (n= 18) ve dişi (n= 18) F344 sıçanlarında mısır yemlerine katılarak verilen tek doz (0,5 mg/kg/va) OTA uygulamasından 24, 48, 72, 96, 672 ve 1344 saat sonra hayvanlarda (n=3) idrar, dışkı, kan ve böbreklerdeki OTA ve metabolitleri floresan dedektörlü HPLC ve LC-MS/MS ile analiz edilmiş ve 96 saat içinde idrardaki değişmeyen OTA miktarı erkek sıçanlarda %2,1 dişilerde ise % 5,2 olarak tespit edilmiştir. Majör metabolit okratoksin α olarak tespit edilirken düşük konsantrasyonda da OTA-glukozidoza rastlanmıştır.

Kandaki maksimum OTA düzeyi uygulamadan 24 ve 48 saat sonra erkeklerde yaklaşık 4,6 $\mu\text{mol/l}$ dişilerde ise 6,0 $\mu\text{mol/l}$ olarak gözlemlenmiştir. Genellikle dokulardaki OTA konsantrasyonunun erkeklerde kadınlardan daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Erkek sıçanların böbreklerindeki OTA konsantrasyonunun dişilerden daha yüksek olması OTA'nın organ-cinsiyete spesifik toksisitesini kısmen açıklamaktadır (Zepnik ve ark.2003).

İnek, sığır gibi geviş getiren hayvanlar, kan dolaşımına geçmeden önce midedeki protozoalar tarafından non-toksik metabolitlerine hidrolize olduğundan OTA'nın etkilerine direnç gösterirler (Kießling ve ark.1984).



Şekil1.8. Okratoksin'nin biyotransformasyonu

1.5.1. Faz I Reaksiyonları

Sitokrom P450 (CYP450, prostoglandin sentaz (PGHS) ve lipooksijenaz (LOX) OTA'nın biyotransformasyonunda görev alan enzimlerdir. Temel olarak ksenobiyotiklerin faz I biyotransformasyon reaksiyonları Sitokrom P450 sistemi tarafından kataliz edilir. Dokulardaki dağılımına göre başlıca karaciğerde bulunur, ancak aynı zamanda bağırsak mukozası, akciğerler, burun epiteli, deri, böbrek, testislerdeki sertoli hücreleri, ovaryum ve plasenta gibi diğer dokularda da sentezlenebilir. Ökaryotik hücrelerde P 450 granülsüz endoplazmik retikulum ve aynı zamanda mitokondrilerde bulunur. OTA biyotransformasyonunda görev alan P450 izoformları konusu tartışmalıdır. OTA biyotransformasyonundaki P450 izoformlarının görevleri ile ilgili önemli

yayınlarından alınan bir özet Çizelge 1.6'da sunulmuştur (Ringot ve ark. 2006). Aynı zamanda siklooksijenaz (COX) olarak da ifade edilen Prostoglandin H-sentaz (PGHS) iki katalitik fonksiyon gösterir; arşidonik asidi hidroperoksi-endoperoksit (PPG₂) 'e çeviren bir COX ve PGG₂'i ilgili alkole dönüştüren peroksidaz. PGG₂'nin PGH₂'ye dönüşümü hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri üretir ve bu nedenle ksenobiyotiklerin biyotransformasyonuna katılabilir (aromatik amin ve fenolik bileşikler). LOX, arşidonik aside moleküler oksijen eklemesini katalizler. Aynı zamanda hidroksiperoksidazın türevi olan çoklu doymamış yağların oluşumunu katalizler böylece peroksil radikalleri üretebilir (Chandrasekharan ve ark. 2002, Jump 2002).

Pinelli ve ark. (1999) PGHS' in OTA'nın genotoksisitesini, insan bronşiyal epitel hücrelerinde 4-OH ve 10-OH OTA biyotransformasyonu ile azalttığını, buna karşılık, LOX ve CYP450 epoksijenaz (CYP2C9 izoformu) yolağının, toksini genotoksik tanımlanmayan metabolitlerine dönüştürdüğünü ileri sürmüşlerdir. Bu metabolitlerin yapısı bilinmemektedir. Ancak OTA kinon-türevleri olduğu ile ilgili şüpheler bulunmaktadır.

El Adlouni ve ark. (2000) OTA biyotransformasyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada OTA'nın 3 genotoksik metabolitini tespit etmişlerdir. Bu biyotransformasyon fenobarbital (PB) uygulaması ile indüklenmiş ve etakrinik asit (EA) uygulaması ile de inhibe edilmiştir. El Adlouni ve ark. (2000) aynı zamanda bu çalışmada OTA'nın CYP2C9 ile biyoaktivasyona uğradığını göstermişlerdir. CYP2C9 izoformu arşidonik asidin epoksi-eikosatriyonik aside epoksidasyonunu sağlar. Buna ek olarak, bu çalışma kobay hücrelerinden alınan PGHS, LOX ve P450 epoksijenazın başta aflatoxin B₁ olmak üzere diğer mikotoksinlerin aktivasyonunda da rol oynadığını göstermiştir.

Çizelge 1.6. OTA'nın Biyotransformasyonunda Görev Alan CYP450 ile İlgili Literatürde Yer Alan Veriler

Reaksiyon	Sitokromlar	Referans
Detoksifikasyon	Sıçan CYP1A1/1A2, 2B1, 2E1, 3A1/3A2	Omar ark. 1996
	Tavşan Böbreği mikrozoamları, insana ait CYP2B6 üreten maya mikrozoamları	El Adlouni ve ark. 2000
	Sıçan karaciğeri CYP1A1/1A2, 3A1/3A2 ve insan rekombinant CYP3A4, 1A2, 2C9	Zepnik ark. 2001
	İnsan rekombinant CYP3A4	Gautier ve ark. 2001
	İnsan rekombinant CYP1A1	Gross-Steinmeyer ve ark. 2002
Biyoaktivasyon	İnsan CYP1A1/1A2, 2C10, 3A4 ile transfekte edilen NIH/3T3 hücreleri	De Groene ve ark. 1996
	Tavşan böbreği mikrozoamları, insan bronşiyal epitel hücreleri, insana ait CYP2B6 üreten maya mikrozoamları	El Adlouni ve ark. 2000
	Sıçana spesifik 2C11	Pfohl-Leszkowicz ve ark. 1998
	İnsan CYP2C9 ile transfekte edilen NIH/3T3 hücreleri	Doorten ve ark. 2004
Biyoaktivasyonu olmayan	İnsan CYP2D6 ve 2E1 ile transfekte edilen NIH/3T3 hücreleri	De Groene ve ark. 1996
	Tavşan böbreği mikrozoamları insana ait CYP2B6 üreten maya mikrozoamları	El Adlouni ve ark. 2000
	İnsan CYP3A4 ile transfekte edilen NIH/3T3 hücreleri	Doorten ve ark. 2004
Biyotransformasyonu olmayan	İnsan Rekombinant CYP1A2, 2E1, sıçana spesifik CYP2C11	Gautier ve ark. 2001

1.5.2. Faz II Reaksiyonları

Üridin-difosfat glukuronosiltransferaz (UGT) ve sülfotranferaz (ST), sırasıyla glukuronid konjugasyonuna ve sülfat konjugasyonuna aracılık ederek ksenobiyotiklerin faz reaksiyonlarında önemli bir rol oynar. Ksenobiyotiklerin glukuronidasyonunda en önemli organ karaciğerdir. Hüresel düzeyde UGT mikrozom membranına bağlı CYP sistemine bitişik bulunur. Endojen glukuronik asit, OTA gibi ksenobiyotiklerin fenolik ya da karboksilik gruplarıyla birleşebilir. Safraya salgılanan glukuronid konjugatı, intestinal mikrofloranın beta-glukuronidazı tarafından aglikona hidrolize edilebilir. Salınan ksenobiyotik bu siklus tekrarlanarak yeniden absorbe edilebilir. ST dokularda (karaciğer, böbrek, intestinal kanal, akciğerler ve beyin) farklı

dağılım gösteren sitozolik enzim süper familyasına tekabül eder. Fenol ve alifatik alkoller geniş ST substratları grubuna dahildirler (Ringot ve ark. 2006).

Roth ve ark. (1988) farelerde [³H]-labelled OTA kullanarak, tek dozluk 288 µg/kg uygulamasından sonra toksinin dağılım profilini incelemişlerdir. Bu çalışmada OTA türevlerinin %28–68 oranında konjugat türevleri olarak (glukuronitler ve sülfat konjugatları) safraya salgılandığını gözlemlemişlerdir. OTA konjugatı aynı zamanda karaciğer (%8–17) ve intestinal dokularda da (%6) tespit edilmiştir. Kühn ve ark. (1995) OTA ile kontamine yemlerle beslenmeye bağlı olarak domuzlarda safrada glukuronid konjugatına rastladıklarını rapor etmişlerdir. Ancak bunun aksine, Gross-Steinmeyer ve ark. (2002) sıçan ve insan hepatositlerinde yapılan *in vitro* deneylerde diğer OTA glukuronid ve sülfat konjugatlarını tespit edememişlerdir. Bu çalışmadaki OTA konjugatlarının gözlenememesi bu konuda açık bir soru bırakmıştır.

1.5.3. Süte Salgılanması

Memelilerde mikotoksinler aynı zamanda süte de salgılanır. Süt bebek ve çocuklar tarafından da tüketildiği için bu önemli bir yoldur. Farklı memeli türlerinde OTA'nın süte geçişini inceleyen pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda oral veya intravenöz OTA uygulaması ya da doğal kontamine yemlerle besleme yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Breitholtz-Emanuelsson ve ark. (1993) yaptıkları bir çalışmada OTA' nın tek dozluk oral uygulamasından sonra toksinin süte geçişinin doza bağlı olduğu sonucuna varmışlardır. Süt/kan konsantrasyon oranları 24 ve 72 saat sonra sırasıyla 0,4 ve 0,7 olarak tespit edilmiştir. Aynı süt/kan oranını, Palminger Hallen ve ark. (1998) yapmış oldukları bir çalışmada süt veren sıçanlarda gastrik intübasyonla 8 hafta boyunca OTA uygulamasından sonra tespit etmişlerdir.

Ribelin ve ark. (1978), mide intübasyonu yoluyla, yüksek tek dozluk (13,3 mg/kg (va)) ya da tekrarlayan düşük dozlarda (1,66 mg/kg (va)) OTA uygulanmış ineklerin sütlerinde OTA ve OT α varlığını izlemişlerdir. 1,66 mg/kg (va) düzeyinden daha düşük düzeylerde OTA uygulanmış ineklerin sütlerinde OTA tespit edilememiştir. Yapılan diğer çalışmalarda da OTA uygulanmış ineklerin sütlerinde OTA' ya rastlanmaması ya da düşük düzeylerde rastlanmasının sebebi Bölüm 1.5' de ifade edildiği gibi ruminantların bağırsaklarındaki bakteri ya da protozoalar tarafında hidrolize uğratılmalarıdır (Pohland ve ark. 1992).

Yapılan pek çok çalışmada insan sütünde OTA'ya rastlandığı rapor edilmiştir (Micco ve ark.1995, Skaug 1998). Bu çalışmalardan ortaya çıkan sonuçlara göre insan sütünde kişiye ve yaşanan coğrafik bölgeye göre değişen miktarlarda OTA bulunmaktadır. Sütte OTA kontaminasyonu ile beslenme arasında bir korelasyon olduğu, sigara alışkanlığı, yaş ve vücut ağırlığı dışındaki diğer antropometrik özelliklerle ilgisinin olmadığı yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Skaug ve ark. 2001).

1.6. OTA'nın Toksisitesi

Çeşitli araştırmalar OTA'nın, karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immünotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır. OTA, DNA kırılmaları, protein sentezinin inhibisyonu ve glikoneogenezis, lipid peroksidasyonu, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması, kanın pıhtılaşmasının engellenmesi ve apoptotik etkisi nedeniyle büyük önem taşımaktadır (SCF 1998).

Birincil etkisi protein sentezinin inhibisyonu ikincil etkisi ise RNA ve DNA sentezinin inhibisyonudur. *In vitro* olarak OTA, fenilalanin t-RNAPhe sentetaz ile yarışmalı olarak bağlanır, amino grup asit açılması ve peptid zincirini uzamasını durdurur. Bu etki *in vitro* olarak fenil alanin konsantrasyonunu arttırarak geri döndürülebilir ve *in vivo* olarak akut etki fenil alanin veya

aspartam ile etkisiz hale getirilir. Ancak 2001’de JECFA karsinojenik etkileri bakımından belirsiz olduğunu bildirmiş ve SCF (1998) ise

- Genotoksisite (şüpheli kanıtlar)
- Kronik renal toksisite
- Fenilalanin-tRNAPhe sentetaz ve protein sentezinin inhibisyonu
- Mitokondrial fonksiyon bozuklukları ve oksidatif stres gibi konularda değerlendirmelerini yapmıştır.

Çeşitli hayvan türlerinde nefrotoksik, hepatotoksik, teratojenik ve immünotoksik etkilere sahiptir ayrıca fare ve sıçanlarda karaciğer ve böbrek tümörlerine neden olmaktadır. Aynı zamanda başta güneydoğu Avrupa ülkelerinde görülen Balkan Endemik Nefropatileri (BEN), idrar yolları tümörleri ile Mısır ve Tunus’ta görülen ve etyolojisi tanımlanamayan nefropatilere neden olmaktadır. IARC tarafından insanda muhtemel karsinojen maddeler olarak 2B grubu içerisinde sınıflandırılmıştır (IARC 1993).

1.6.1 Akut ve Kronik Toksisitesi

OTA’nın akut letal dozu, yaygın multifokal hemorajiler, intravasküler koagülasyon ve karaciğer, böbrek ve lenfoid gibi organlarda nekrozlara neden olur. Hassasiyet bakımından türler arasında büyük varyasyonlar gözlenir. Oral LD₅₀ değeri; köpeklerde 0,2 mg/kg (va); domuzlarda 1 mg/mg/kg (va); sıçanlarda 20–30,3 mg/kg (va) ve farelerde 46–58,3 mg/kg (va) olarak bulunmuştur (Çizelge 1.7) .

Çizelge 1.7. OTA’nın Çeşitli Türlerdeki LD₅₀ Değerleri (Kuiper –Goodman 2008)

Türler	LD ₅₀ (mg/kg/(va))		
	Oral	İntraperitoneal	İntravenöz
Fare	46–58,3	22–40,1	25,7–33,8
Sıçan	20–30,3	12,6	12,7
Yeni doğmuş sıçan	3,9		
Köpek	0,2		
Domuz	1		
Tavuk	3,3		

OTA'nın test edildiği hayvan türleri üzerinde potansiyel böbrek toksini olduğu görülmüştür. Uzun-dönem çalışmalar, doza ve zamana bağlı olarak gelişen nefropatlere neden olduğunu göstermiştir. Çizelge 1.8'de çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen NOEL ve LOEL değerleri verilmiştir.

Çizelge 1.8 OTA'nın Çeşitli Hayvan Türlerindeki Nefrotoksisite ve Karsinojenitesiyle İlgili LOEL ve NOEL Değerleri (Walker ve Larsen, 2005)

Tür	Etki	Çalışma süresi	LOEL ($\mu\text{g}/\text{kg}$ va/gün)	NOEL ($\mu\text{g}/\text{kg}$ va/gün)
Fare (erkek)	Böbrek tümörü	2 yıl	4,400	130
Sıçan (erkek)	Proksimal tüp hücrelerinde karyomegali	90 gün	15	Oluşturulmadı
	Böbrek tümörü	2 yıl	70	21
Domuz	Bozuk renal fonksiyonlar	90 gün	8	Oluşturulmadı
	İlerleyen nefropatiler	2 yıl	40	8

Petrik ve ark. (2003) düşük dozlarda OTA'nın böbrek hücreleri üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, Wistar sıçanlarını 10, 30, 60 gün süreyle günlük 120 μg OTA/kg (va) dozlarında OTA'ya maruz bırakmışlardır. Böbreklerdeki toksin konsantrasyonu maruziyet zamanı ile orantılı olarak 10, 30, 60 gün sonra sırasıyla 547,2, 752,5 ve 930,3 ng OTA/g miktarlarına ulaştığını gözlemlemişlerdir. OTA ile muamelenin böbrekteki proksimal ve distal epitel hücrelerinde apoptozisli hücre sayısının artmasına neden olduğu görülmüştür. Apoptik hücreler, TUNEL assay kullanılarak gözlemlenmiş ve yerine uygun olarak hematoksilin ya da eozin boya ile boyanmıştır. 10, 30 ve 60 gün boyunca muameleden sonra apoptik hücrelerin sayısı sırasıyla 5-, 6,4- ve 12,7- kat artmıştır. Bununla beraber, DNA elektroforezi karakteristik fragmentasyon göstermemiştir. Malondialdehit oluşumunun artması oksidatif stres oluştuğunun kanıtıdır. Lipit peroksidasyonu %36'lık bir artış göstermiştir ancak maruz bırakılan sıçanlarda superoksit dismutaz aktivitesi 60 gün içinde %26 oranında azalmıştır. Böbrek hücrelerinde biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlemlenmiş olmasına rağmen böbrek fonksiyonel durumu

deney sonuna kadar korunmuştur. Sonuç olarak düşük dozlarda OTA maruz kalmanın apoptozu ve oksidatif hasarı aktive etmekte olduğu rapor edilmiştir.

1.6.2 Hepatotoksitesisi

Hepatoksitesisi ilgili araştırmalar OTA' nın karaciğerde apoptoza neden olduğu gözlemlenmiştir. Atroshi ve ark. (2000) farelere OTA uygulamasından sonra karaciğerde apoptoz görülmesi ile ilgili bir çalışma düzenlenmiştir. Bir ve iki haftalık periyotlarla haftada 2 kez OTA uygulamasından sonra fare karaciğerinde apoptoz gözlenmiş ve toksin uygulamasından sonra 2 haftada apoptoza uğramış yapılar tespit edilmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde sağlam karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında daha çok apoptotik yapılar içeren eozinofilik globullere rastlamışlar ve iki haftada bu apoptotik yapıların sayısının kontrol değerlerinin 8 katı kadar arttığını gözlemlemişlerdir. Birinci haftada yapılan biyokimyasal ve histolojik analizlerle hücresel nekrozlarla ilgili olarak hiçbir belirti ortaya çıkmamış ancak ikinci haftada sentrilobular nekrozlar gözlemlemişlerdir.

1.6.3. Nefrotoksitesisi

OTA' nın hedef organı böbreklerdir. OTA, Danimarka domuz nefropatisi ve sıçanlarda renal adenoma ve karsinomaların görülme sıklığının artışına neden olur. Fizyolojik çalışmalar, OTA' nın nefron boyunca farklı yerlerde aktivite gösterdiğini açıklamıştır. Akut olarak OTA'ya maruz kalma, postproksimal nefronfonksiyonunda bozulmaya yol açar, özellikle toplama kanalında elektrolit ve titre edilebilen asit atılımında değişikliklere sebep olur. Bu mekanizma; OTA'nın nanomolar konsantrasyonları ile kültür böbrek hücrelerinde görülen hücresel asit-baz dengesinin bozulması ve plazma membrandaki anyon iletiminin engellenmesi ile benzerlik göstermektedir. Hücresel pH dengesinin bozulması, OTA'nın kültür böbrek hücrelerine transforme olmasıyla ortaya çıkabilir. Kronik olarak OTA'ya maruz kalma ürenin konsantrasyonunda azalmaya neden olur. OTA'ya kronik maruz

kalma, proksimal tübülün renal hemodinamiği ve salgı fonksiyonunu etkilediği halde akut maruz kalma etkilememektedir. OTA, renal kan akışını ve glomerular filtrasyon oranındaki azalma ile vas deferens'in geçirgenliğini artırır. OTA, sıçan proksimal tübül hücre kültürüne nanomolar konsantrasyonlarda uygulandığında mutajenik potansiyele sahiptir, ancak mikromolar konsantrasyonlarda hücre gelişimini inhibe eder. OTA, doz ve zamana bağlı olarak renal fonksiyon üzerinde kompleks etkiler ortaya çıkarır (Elling ve ark. 1985, Gekle ve Silbernagl 1996, Soyöz ve Özçelik 2002).

Bulgaristan, eski Yugoslavya ve Romanya'da 1950'li yıllarda yapılmış olan pek çok yayında Balkan Endemik Nefropati olarak bilinen böbrek hastalığı hakkında çalışmalardan bahsedilmiştir. Başlıca renal patoloji problemleri semptomlarının görülmesinden kısa bir süre sonra tedavi edilemeyen ve ölümlü sonuçlanan bir hastalık ortaya çıkmıştır. Bu hastalık WHO uzmanları tarafından "ilerleyen, gitgide gelişen ve sinsice atak yapan renal bozukluk" olarak tanımlanmıştır. Belirgin anemi, orta derecede proteinüri ve önemsiz üriner kalıntı görülür. Tüm vakalarda ve glomerüler filtrasyon sınırlama dercesine bağlı olmaksızın böbrek konsantrasyon yeteneği azalır"; ağır tubular epitelyum hasarlarına neden olan non-enflamatuar kökenli interstitial nefropatiler ve sonunda aşırı renal kasılmalar gösteren glomerulusun yalnızca geç ve ikincil harabiyeti son aşamada özellikle kaybın olduğu tubulus ve pek çok fibrotik glomerulusun bulunduğu korteksin dış kısmında belirgin fibrozis görülür. Bu aşmada kronik ve akut enflamasyon yaygın değildir" bundan sonra bu hastalık Balkan Endemik Nefropati (BEN) olarak belirtilmiştir. Daha sonra, BEN problemi yalnızca nefrolojik değil aynı zamanda onkolojik hale geldiğinden BEN ve idrar yolu tümörleri arasındaki ilişkisi tanımlanmıştır. 50 yaşından daha genç bireylerde sadece birkaç vakaya rastlanmış olmasına rağmen genellikle 50-60 yaş arasında ve sonrasında tümör oluşumu gözlenir. En çok etkilenen organ renal pelvis ve ureterdir.

Hult ve ark. (1982) Yugoslavya'daki BEN hastalığının görüldüğü bölgelerden topladıkları insan kan örneklerinin %7 sinde OTA'ya rastlamışlardır. Bu durum Radic ve ark. (1997) tarafından da doğrulanmıştır. Bulgaristan'da hastalıktan etkilenen insanların kanlarında OTA ortaya çıkma sıklığının 2 ng/mL'yi aşan düzeylerde tespit edilmesi ile OTA ya maruz kalma görüşü doğrulanmıştır. Aynı zamanda OTA BEN-endemik kasabalarda, BEN-endemik olmayan kasabalardaki insanların idrarlarına göre daha yüksek oranlarda rastlanmış ve en yüksek düzeyler de idrar yolu tümörü olan ya da BEN hastalarında tespit edilmiştir.

1.6.4. Genotoksitesi

OTA kemirgenlerde potansiyel nefrotoksik ve renal karsinojen etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar OTA'nın DNA hasarı, DNA onarımı, *in vitro* memeli hücrelerinde ve *in vivo* muamele edilmiş fare hücrelerinde kromozom aberasyonlarına neden olduğunu göstermiştir. Bununla beraber, genotoksisite mekanizması açıklanamamış ve DNA'ya doğrudan etkisi ile ilgili henüz bir kanıt bulunamamıştır (Risk Assessment Studies Report No:23 2006) .

1.6.5. DNA-Katım Ürünü Oluşumu

Yapılan çalışmalar farelere OTA verilmesinden sonra DNA-katım ürünü oluşumunun epigenetik orijinli olduğunu göstermiştir. Pfohl-Leskowicz ve ark. (1998) 32P-post-lebelling yöntemi ile izleme çalışmasında oral yolla 2,5mg/kg OTA uygulanmış farelerde OTA'nın genotoksik etkilerini ve OTA-DNA katım ürünü oluşumunu incelemiştir. Uygulamadan sonra karaciğer, böbrek ve dalaktan alınan hücrelerin DNA'larında çok sayıda modifiye nükleotide rastlamışlardır. Ancak elde edilen düzeyler 16 günlük periyottan sonra dokuya ve zamana bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Toplam DNA-katım ürünü sayısı 48 saat içinde maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bu süre içerisinde en yüksek düzeye 103 katım ürünü/10(9) nükleotid olarak

böbreklerde rastlanmış olması, OTA'nın karsinojenitesi gibi genotoksitesisi için de hedef organın böbrek olduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada da prostaglandin H sentaz (PGHS) inhibitörü olan indometasin kullanılmasının böbrek ve idrar kesesinde DNA-katım ürünü oluşumunu büyük ölçüde engellediği görülmüştür. Daha sonra yapılan *in vitro* deneylerde böbrek mikrozomlarının DNA, OTA ve arşidonik asit ile inkübasyonu ile PGHS'nin bu rolü araştırılmıştır. Sonuçlar OTA'nın metabolizması sonucu doğrudan genotoksik aktivitesi ile ilgili yapılan *in vivo* deney sonuçları ile uygunluk göstermiştir. Ayrıca ko-substrat olarak NADPH₂ kullanılması (sitokrom P450'nin rolünün açıklanabilmesi amacıyla) sonucu elde edilen DNA-katım ürünü düzeyinin arşidonik asit kullanılması sonucu elde edilen değerden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç PGHS'nin peroksidaz aktivitesi tarafından OTA'nın aktive edilmesi hipotezini desteklemektedir. PGHS'nin peroksidaz aktivitesine çok yakın enzimatik aktivite gösteren Horseradish peroksidazın da DNA-katım ürünü oluşumu üzerine etkisi olduğu bildirilmektedir (Obrecht-Pflumio ve Dirheimer 1999).

Ancak OTA'nın tümör oluşumunu etkileme mekanizması tam olarak bilinmemekte, potansiyel OTA-DNA formasyonu ile ilgili elde edilen bilgiler üzerinde tartışmalar devam etmektedir. Yavaş metabolize edilen OTA ile yapılan *in vitro* veya *in vivo* çalışmalar DNA'ya bağlanma eğilimi olan herhangi bir aktif maddesini tespit edememiştir. Son zamanlarda OTA'nın elektrokimyasal oksidasyon ve fotoreaksiyon ile oluşturulan hidrokinon/kinon redoks çifti ve karbon bağlı OTA-deoksiguanozin (OTA-dG) katım ürünü formunun OTA'nın karsinojenitesi ile ilgili fikirlerin ortaya atılmasına neden olmuştur (Zepnik ve ark. 2001). Mally ve ark. (2004) DNA'ya bağlanmadaki rolünü ortaya koymak ve *in vivo* olarak bu türevlerin oluşup oluşmadığını ve de hassas ve spesifik yöntemler kullanarak *in vitro* olarak ilgili aktivasyon sistemlerini belirlemek amacıyla bir çalışma düzenlemişlerdir. OTA'nın horseradish peroksidaz aktivasyonu ve deklorine analogu olan OTB'den OTA-hidrokinon (OTHQ) elde edilmiş ancak LC-MS/MS ile yapılan analizler sonucu istenen OTA-dG tespit edilememiştir. Aynı zamanda ³²P-etiketleme

ile yapılan çalışmada DNA katım ürünü yapıya rastlanmaması bu durumu desteklemiştir. *In vivo* çalışmada 2 hafta süre ile yüksek dozda (2 mg/kg va) OTA verilen F344 erkek sıçanların idrarlarında OTHQ yalnızca iz miktarda bulunmuş bu da bu metabolitin bu kapsamda oluşmadığını göstermiştir. *In vitro* verilerle paralel olarak OTA verilen hayvanların karaciğer ve böbreklerinden alınan örneklerin LC-MS/MS ile yapılan analizlerinde de DNA katım ürünü formuna rastlanmamıştır. Araştırma sonucunda, oldukça hassas analiz yöntemleri ile yapılan çalışmalarda OTA'nın DNA'ya bağlanması ile ilgili bir formasyon teşhis edilememiş diğer bir deyişle OTA'nın tümör oluşumundaki mekanizması ile ilgili açıklayıcı bir bilgi edinilememiştir.

Sonuç olarak DNA bağlanması ile ilgili pek çok çalışma olmasına karşın oluşum mekanizması ve etkisi ile ilgili bilimsel bir konsensüs oluşmamıştır (Cavin ve ark. 2006). EFSA, yapılan *in vivo* çalışmaların DNA katım ürünü oluşumu ile ilgi gerçek kanıtları sunması bakımında yeterli bulunmadığı görüşünü bildirmiştir. İlginç bir şekilde, OTA etkili DNA hasarının doğrudan OTA-DNA bağlanması gerektirmediği, bunun oksidatif stres ve sitotoksosite gibi dolaylı mekanizmalar ile ilgisinin olduğu rapor edilmiştir (EFSA2006).

1.6.6. Teratojenik Etkileri ve Gelişimsel Toksisitesi

OTA'nın embriyonik dönemde fetüsün gelişimi üzerine etkileri ile ilgili olarak deney hayvanlarında yapılan çalışmalar embriyonik dönemde bu toksine maruziyetin maruziyet dozu ile doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir.

Jong Chun ve ark. (1994) hamileliğin 7. gününde oral yolla tek doz OTA verilen sıçanlarda OTA'nı embriotoksitesi ilgili olarak yapılan bir çalışmada ayrıca fenilalaninin (Phe) OTA teratojenitesi üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu çalışmada OTAI (1mg/kg/gün), OTAI (3mg/kg/gün), OTAI+Phe (sırasıyla3+50mg/kg/gün), OTAI (5mg/kg/gün) ve son olarak kontrol grubundan oluşmak üzere 5 gruba ayrılan, deneklere yalnızca hamileliğin 7. gününde OTA besinleriyle, Phe ise derialtından verilmiştir. Tüm embriyolar

hamileliğin 20. gününde sezaryenle alınmış ve embriyo gruplarındaki anormallikler incelenmiştir. OTAI grubunda herhangi bir embriyonal gelişim anomalisi gözlemlenmemiştir. OTAll grubuna ait fetüslerde fetal vücut ağırlığında azalma, fetal ölümlerde artış, fetal abnormalite görülmesi sıklığında artış ve gecikmiş kemikleşme gözlemlenmiştir. Gastroşkisis, ödem, hematoma, ayak kusurları (club foot), lateral ventrikülde genişleme, anoftalmi, özofagus pozisyonunda değişiklik, yarı göğüs kemiği, kaynaşmış kaburgalar içeren karakteristik malformasyonlar gözlemlenmiştir. OTAllI grubunda ise OTAll grubuna kıyasla daha güçlü maternal ve gelişimsel toksik etkiler bulunmuştur. Özellikle %76,3 insidansında fetal ölümler gerçekleşmiştir. OTAll+Phe grubunda Phe etkisi ile OTA'nın teratojenik etkileri belirgin şekilde azalmıştır. Bu sonuç OTA'nın maternal toksik dozlarda, sıçanlarda embriyotoksik etkilere sahip olduğunu ve teratojenik etkinin hamilelik döneminde OTA maruziyeti ile arttığı Phe verilmesi ile azaldığını göstermiştir.

Buna benzer diğer bir çalışmada OTA uygulanmış hamile farelerin hamileliğinin 7–8. günlerinde belirlenmiş olan hücrelerde aşırı hücre ölümleri gözlemlenmiştir. 2–4 mg/kg tek dozlu OTA uygulamasından sonra 6 saat içinde hücre ölümleri belirgin şekilde artmış 36 saat sonra ise en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Hamileliğin 14 ya da 18. günlerinde yapılan incelemede kranofasiyel malformasyonlar, eksansefali, midfasiyal yarıklar, yarı dudak, hipotelorizm ve holoprosensefali ile ilişkili sinoftalmi geliştiği gözlemlenmiştir. Özellikle OTA-kaynaklı seçici hücre ölümleri tartışmalıdır (Wei ve ark. 2005).

Çeşitli düzeylerde OTA içeren (0, 1, 2 ve 4 ppm) yemlerle beslenmiş Rhode Island Kırmızı genç tavuklarının embriyogenezinin 17 ve 20. günlerinde ölen embriyolarının karaciğer, böbrek ve kalpleri incelenmiştir. Genç tavuk yemlerindeki OTA'nın embriyo ölümlerine karaciğer ve böbrek bozuklukları şeklinde görülen değişimlere neden olan embriyo anomalilerine neden olduğu bildirilmiştir (Niemi ve ark. 1990).

Fukui ve ark. (1991) tarafından yapılan bir çalışmada hamile Slc: ICR farelerine hamileliğin 10. gününde 3 mg OTA/kg enjekte edilmiştir. Deneyler sonucunda OTA uygulanmış olan farelerde nöron dansitesinin kontrol grubuna kıyasla %39 oranında arttığı ancak sinaps dansitesinde bir fark olmadığı ortaya konulmuştur. Kontrol grubundaki farelerin paryetal korotekslerinde her nöron için 13.000 sinaps varken, OTA uygulanan farelerde nöron başına 9400 sinaps görülmüştür.

1.7. OTA'nın Toksisitesi Üzerine Etki Eden Faktörler

Yapılan pek çok çalışmada antioksidanlar, aspartam ve fenil alanin uygulaması gibi bazı faktörlerin OTA'nın toksisitesi üzerine etki ettiğini göstermiştir. Atroschi ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada Koenzim Q₁₀, L-Karnitin, Zn, Mg, N-Asetilsisteyin, vitamin C ve selenyum ya da tamoksifen gibi antioksidan komplekslerinin uygulaması ile OTA tarafından fare karaciğerinde oluşturulan apoptozisin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu indirgeyiciler ile bir haftalık OTA uygulamasıyla görülen azalma iki haftalık uygulamadan daha fazla olmuştur. Ancak tamoksifen uygulaması OTA uygulaması ile karaciğerde oluşan apoptotik yapıların inhibisyonunda önemli bir azalmaya neden olamamıştır. Hepatik glutatyon karaciğer harabiyetine neden olan toksikantlara karşı en önemli koruyucu olması nedeni ile bu çalışmada apoptozis inhibitörü olarak bilinen indirgenmiş glutatyonun (GSH) aktivitesi çalışılmıştır. Bulgular iki haftalık uygulamadan sonra OTA'nın GSH aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte antioksidan kompleksinin kullanılması hepatik indirgenmiş glutatyon düzeyinin artışı ile belirlenen hepatik detoksifikasyon/antioksidan sistemi zenginleştirdiği görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, iki haftalık OTA uygulamasının apoptozise neden olduğu ve antioksidan kompleksinin kullanımı ile bu hücre ölümlerinde azalma meydana geldiği ortaya konmuştur.

Haubeck ve ark. (1981) OTA'nın immünosupresif etkisi üzerine fenilalaninin etkisini test etmek için yaptıkları bir çalışmada OTA'nın

farelerdeki immünosupresif etkisini gözlemlemiş ve daha sonra fenilalanin-OTA kombinasyonu, fosfatlı tuz çözeltisi-OTA kombinasyonu ya da yalnız OTA verdikleri farelerde immünosupresif etki düzeyini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada fenilalanin konsantrasyonunun OTA konsantrasyonundan iki kat daha fazla olduğu durumlarda immünosupresif etki gözlemlenmediği ya da etkinliğinin azaldığı rapor edilmiştir.

Belmadini ve ark. (1998) ise OTA'nın yapısal analogu olan Aspartam'ın, OTA'nın vücuttaki dağılımını etkilediği ve beyinde birikimini aynı zamanda Tirozin (Tyr) ve Fenil alanin (Phe) modifikasyonunu önlediğini ortaya koymuşlardır. Histolojik çalışmalar OTA verilen hayvanlarda büyük sıklıkla görülen piknotik çekirdekli nekrotik hücre sayısının aspartam verilen hayvanlarda kontrol grubuna göre daha az sıklıkla görüldüğünü ortaya koymuştur. Aspartamın bu çekirdek üzerine olan etkisini de azalttığı gözlemlenmiştir.

Son dönemlerde OTA'nın lipit peroksidasyonu tetiklediği ve lezyonlara neden olmasının oksidatif hasarla ilişkisi olduğu bildirilmiştir. Baudrimont ve ark. (1997) yaptığı bir çalışmada başlıca lipit peroksidasyonu olmak üzere bu toksik etkinin önlenmesi için OTA ve fenilalaninin yapısal analogu olan aspartam (L-fenilalanin metilester), bir antisteroidal ilaç olan piroksikam ve superoksidismutaz+katalazı (endojen oksijen radikali yakalayıcısı) kullanmışlardır. Lipit peroksidasyonu, OTA konsantrasyonu artırılarak muamele edilmiş eşek böbrek hücrelerinde (Vero hücrelerinde) (5–50 μ M) denenmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra, malondialdehit (MDA) üretimi cinsinden konsantrasyona bağlı olarak OTA'nın lipit peroksidasyonu tetiklediği görülmüştür. Vero hücrelerinde MDA üretimi %50,5 oranında 694,1 \pm 21,0' dan, 1041,5 \pm 23,5 pmol/mg proteine kadar belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Süperoksidismutaz (SOD)+katalaz (her biri için 25 μ g/mL) varlığında ise OTA tarafından arttırılan MDA üretiminin belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada 50 μ M OTA konsantrasyonunda (optimal MDA üretimi) MDA üretiminin 1041,5 \pm 23,5 'den 827,5 \pm 21,3 pmol/mg

proteine kadar belirgin bir şekilde azalma gösterdiği görülmüştür. SOD+katalaz uygulamasının lipit peroksidasyonu piroksikam ve aspartam uygulamalarından daha yüksek düzeyde engellediği belirtilmiştir. Bu moleküllerin aynı zamanda kültür ortamlarında da OTA-etkili MDA üretimini kısmi olarak engellediği rapor edilmiştir.

Oksidatif hasar OTA'nın geniş aralıktaki toksik etkilerine katkıda bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada α - tokoferol (α -TOC) ve farklı polifenollerin-kateşin (CAT), diadzein (DAI), epikateşin (EC), epigallokateşin gallat (EGCG), genistein (GEN) ve kuersetin – HepG2 karaciğer hücrelerinde meydana gelen OTA kaynaklı toksisite üzerine etkileri incelenmiştir. HepG2 karaciğer hücrelerinde, gittikçe artan dozlarda OTA uygulamasıyla doz- ve zamana- bağlı sitotoksosite nötral kırmızı deneyi ile ölçülmüştür. OTA'nın yarı letal konsantasyon (LC_{50}) 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra sırasıyla 35 ve 10 μ M olarak belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinin α -TOC ve diğer farklı polifenol inkübasyonunun OTA kaynaklı sitotoksisiteyi önlemediği görülmüştür. Bu sonuç, OTA'nın toksik etkisini doğrudan α -TOC ve polifenol ile kontrol edilen mekanizmalardan farklı bir mekanizma ile gerçekleştirme ihtimalinin olduğunu göstermiştir (Hundhausen 2005).

1.8. Gıdalarda OTA'nın Bulunuşu

OTA başlıca hububat ve hububat ürünlerinde bulunur. Avrupa Komisyonu tarafından yapılan maruz kalmayı değerlendirme çalışmalarında bu besin maddelerinin OTA' ya başlıca maruziyet kaynağı olduğu bildirilmiştir. Avrupa ülkelerinde bu oranın beslenme ile OTA'ya maruziyetin %50'si olduğu hesaplanmıştır (SCOOP task 3.2.7, 2002).

Başlıca vücuda alımı hububatlar (buğday, arpa, yulaf), hububat ürünleri, kahve, bira ve şarap ile olan OTA, ısı ve diğer gıda işlemleri altında dahi stabil bir yapıya sahiptir. Aynı zamanda OTA, mikotoksinlerle kontamine olmuş gıdalarla beslenen hayvanların etlerinin yenilmesi sonucu da vücuda

alınmaktadır (SCF 1998). Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesinin (EFSA) Gıda Zincirindeki Kontaminantlar Paneli (CONTAM) *Penicillium* ve *Aspergillus* gibi küf türleri tarafından üretilen, doğal bir mikotoksin olan OTA ile ilgili fikirlerini yayınlamıştır. Bu panel; OTA'nın tüketildiğinde böbreklerde biriktiği ve özellikle bu organda toksik etkilere sahip olduğu kararına varmıştır. Panel mevcut veriler dikkate alarak OTA için daha önceki 100 ng/kg (va) olan Haftalık Tolere edilebilir Alımı (TWI) 120 ng/kg (va) olarak değiştirmiştir. Genel populasyon için OTA haftalık maruziyeti; 15–60 ng/kg (va) olarak değişmekte bu da bu değerin altında kalmaktadır. Uzmanlar gıdalardaki OTA düzeylerini düşürmek için daha fazla çaba harcanmasını ve hassas gruplara ait daha spesifik maruziyet verilerini elde etmek için izleme programlarının oluşturulmasını tavsiye etmektedirler. Başlıca hububat ve hububat ürünleri, üzüm ve üzümünden elde edilen ürünler (sirke, şarap, üzüm suyu, kuru üzüm), kahve, kırmızıbiber, kurutulmuş meyve, baharatlar OTA maruziyetine sebep olacak muhtemel gıda ürünleri arasındadır.

1.8.1. Gıda Maddelerinde OTA için Düzenleyici Konsantrasyon Limitleri

Depolama ve saklama tekniklerinde büyük gelişmeler olmasına rağmen, mevcut bilimsel ve teknik bilgiler ışığında, bu gelişmelerin gıdaların saklanması ve depolanması sırasında gelişen küfleri tamamen önlemesinin mümkün olmayacağı öngörülmektedir. Sonuç olarak OTA gıdalardan tamamen elimine edilememektedir. Bu nedenle mümkün olduğu kadar düşük düzeyde (As Low As Reasonably Achievable-ALARA) toksinin bulunmasına izin veren düzenleyici limitlerin oluşturulması gerekliliği ortaya çıkmıştır (Byrne, 2002). Çeşitli ülkeler farklı gıda maddelerinde OTA için limitler oluşturmuşlardır. Bazı ülkelere ait limitler Çizelge 1.9. 'da gösterilmektedir.

Çizelge 1.9. Gıda Maddelerinde OTA için Konsantrasyon Limitleri

Gıda maddesi	Konsantrasyon limiti (µg/kg)	Ülke	Referans
Hububat, işlem görmemiş	5,0	AB	Kyprianou 2005
Hububat işlem görmüş	3,0	AB	Kyprianou 2005
Hububat	20,0–50,0	Brezilya-İsrail	FAO 2003
İşlenmemiş tahıl taneleri (çeltik ve karabuğday dahil)	5,0	Türkiye	Resmi Gazete 2008
Tahıllardan elde edilen bütün ürünler (tahıl bazlı işlenmiş ürünler ve doğrudan insan tüketimine sunulan tahıl taneleri)	3,0	Türkiye	Resmi Gazete 2008
Hububat	2,0	İsviçre	FAO 2003
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları	0,5	Türkiye	Resmi Gazete 2008
Kuru üzüm	10,0	Türkiye	Resmi Gazete 2008
Çiğ kahve	20,0	Yunanistan	FAO 2003
Kavrulmuş kahve çekirdeği ve öğütülmüş kahve	5,0	Türkiye	Resmi Gazete 2008

1.8.2. Türkiye’de Gıdalarda OTA Düzeyleri İlgili Çalışmalar

Türkiye’de gıda olarak tüketilen bitkisel ürünlerdeki mikotoksin kalıntılarıyla ilgili çalışmalar Antep fıstığında ve kuru incirlerde aflatoksin ve aflatoksin üreten küflerin saptanmasıyla hız kazanmakla beraber genelde aflatoksinlerle sınırlı kalmış; okratoksinlerle ilgili araştırmalar ise 1990’lı yıllarda başlamıştır. Ancak bu çalışmaların sayısı da Türkiye’deki OTA problemini açıkça ortaya koyacak kadar çok değildir ve yapılan bu çalışmalar da genelde daha önceki çalışmalarla aflatoksin içeriği açısından dikkatleri üzerine çeken gıda maddelerinde yoğunlaşmıştır (Anon 1996).

Sonal ve Oruç (2000) tarafından yapılan bir çalışmada Bursa ve yakın çevresindeki tavuk çiftliklerinden Haziran–2000 tarihinde alınan 27 yem örneğinde total aflatoksin, aflatoksin B₁, OTA, T–2 toksin, zearalenon ve fumonisin düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmada, ELISA yöntemiyle yapılan analizler sonucunda ortalama mikotoksin düzeyleri, total aflatoksin 6,937±2,304 µg/kg, aflatoksin B₁ 0,862±0,225 µg/kg, OTA 4,3619±0,4586

$\mu\text{g}/\text{kg}$, T-2 toksin $58,596 \pm 2,455 \mu\text{g}/\text{kg}$, zearalenon $78,64 \pm 31,766 \mu\text{g}/\text{kg}$ ve fumonisin $188 \pm 25,38 \mu\text{g}/\text{kg}$ olarak saptanmıştır. Aflatoksin bulunma oranları, total aflatoksinde % 100 ve aflatoksin B₁'de % 65,38 olarak hesaplanmış ve OTA, T-2 toksin, zearalenon ve fumonisin rastlantı oranlarının ise % 100 olduğu görülmüştür. Araştırmanın sonucu olarak, yem numunelerindeki mikotoksinlerin, bireysel olarak tavukların sağlık ve verimlerinde bir risk oluşturmayacağı ancak, birlikte bulunmalarının tavukçuluk işletmelerinde ekonomik sorunlara yol açabileceği kanısına varılmıştır.

Bir diğer çalışmada, aşurelik buğday, mısır, mısır unu, yulaf gevreği, yulaf ezmesi, yulaf unu ve müsliden oluşan toplam 100 adet gıda örneğinde OTA taraması yapılmış ve örneklerin fungal yükleri saptanmıştır. Analiz edilen 100 örnekten 1 adet aşurelik buğday, 2 adet mısır ve 1 adet yulaf ezmesi olmak üzere toplam 4 örnekte 0,27–9,84 ppb düzeyleri arasında değişen OTA varlığı saptanmıştır. (Karagözlü ve Karapınar 1998).

Var ve Kabak (2007) tarafından 34 beyaz, 10 pembe ve 51 kırmızı olmak üzere Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan 95 şarap örneğini IAK temizleme ve floresans dedektörlü HPLC yöntemi ile analiz etmişlerdir. Toplam örneklerin yaklaşık %86'sında (82 örnek) Avrupa Komisyonu tarafından belirlenmiş olan maksimum izin verilebilir düzeyin altında ($< 0,006-0,815 \text{ ng/ml}$) OTA'ya rastlamışlardır. Kırmızı şaraplarda elde edilen ortalama OTA değerinin beyaz şaraplardan elde edilen değerlerden biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra, coğrafik bölge farklılıklarının oldukça yüksek olduğu; Türkiye'nin Trakya ($n = 44$, ortalama = $0,158 \text{ ng/ml}$ OTA) ve Ege bölgelerinden ($n = 28$, ortalama = $0,060 \text{ ng/ml}$ OTA) toplanan örneklerdeki OTA düzeylerinin orta Anadolu ($n = 15$, ortalama = $0,027 \text{ ng/ml}$) ve batı Anadolu ($n = 8$, ortalama = $0,027 \text{ ng/ml}$) bölgelerinden toplanan örneklere göre yüksek kontaminasyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları; Türkiye'de şaraplarda OTA ile kontaminasyona rastlanma sıklığının yüksek

olmasına karşın, elde edilen düzeylerin şarap tüketiminin insan maruziyetine çok önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Kayseri yöresinde yapılan bir çalışmada farklı ambar ve farklı tahıl ürünlerinden 25 adet buğday unu, 25 adet pirinç ve 25 adet bulgur numunesinde OTA kontaminasyonları araştırılmıştır. Numunelerdeki OTA düzeylerinin tespitinde ELİSA testi kullanılmıştır. Elde edilen bulgular incelendiğinde, buğday ununa ait en yüksek değer $1011,84 \pm 0,08$ ppt olurken, en düşük değer $14,66 \pm 0,09$ ppt olarak tespit edilmiş, ortalama OTA değeri $360,93$ ppt olarak kaydedilmiştir. Pirinç numunelerinde yapılan değerlendirmede, en yüksek ve en düşük sonuçlar sırasıyla $381,93 \pm 0,08$ ppt ile $153,76 \pm 0,06$ ppt olup, ortalama değer $241,07$ ppt olarak bulunmuştur. Bulgur numunelerinin ise en yüksek OTA değeri $548,80 \pm 0,06$ ppt, en düşük OTA değeri $158,53 \pm 0,07$ ppt ve ortalama OTA değeri $384,10$ ppt olarak belirlenmiştir. Çalışılan numunelerde OTA seviyesinin $145,66$ ppt ile $1011,84$ ppt arasında olduğu saptanmıştır (Şeviktürk ve Gönülalan 2007).

Ankara İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde sürdürülmekte olan ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan hububat ve hububat ürünlerinde OTA düzeylerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmanın 2006–2007 dönemine ait çalışma sonucunda (Çizelge 1.10) hububat ve ürünlerinde OTA düzeylerinin Türkiye'de yasal limitlerin altında olduğu görülmüştür.

Çizelge 1.10. Türkiye'nin Çeşitli Bölgelerinden Toplanan Hububat Ve Ürünlerinde OTA'ya Rastlanma Durumları (TAGEM. 2008)

Hububat türü	TEDB	0,2 – 3 ppb	Limiti Aşan Numune Sayısı	Toplam Numune Sayısı
Pirinç	66	1	-	67
Buğday		2	-	2
Un	68	29	-	97
Diğer Hububat Ürünleri (makarna, bulgur, ekmek, vs)	131	34	-	165
TOPLAM	265	66		331

1.9. İdrarda OTA ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Pascale ve ark. (2000) tarafından idrardaki ppt (pg/mL) düzeyindeki OTA'nın ölçülebilmesi için hızlı ve doğru bir yöntem geliştirilmiştir. Toksinin ölçülebilmesi için uygulanan bu yöntemde IAK temizleme ve floresan dedektörlü ters faz HPLC kullanılmıştır. İnsan idrarında yapılan geri alma çalışmalarında 0,05 ng/mL ve 1,0 ng/mL düzeyinde ekleme (spiked) yapılan örneklerde sırasıyla % 88 ve % 93' lük geri almalar % 1-% 8 arasında değişen rölatif standart sapmalarla (RSD) elde edilmiştir. Bu çalışmada tespit limiti (LOD) 0,005 ng/mL (S/N=3:1) olarak hesaplanmıştır. 41 insan idrar örneğinden 25'inde OTA tespit edilmiş ve yalnızca bir hastaya ait idrar örneğinde 0,05 ng/mL lik limiti aşan OTA miktarı tespit edilmiştir. Bu yöntem epidemiyolojik çalışmalarda insan ve hayvanlardaki OTA'ya maruziyetin değerlendirilmesi akut hayvan intoksikasyonu yada insanlardaki renal hastalıklarda OTA'nın oynadığı rolü belirlemede kullanılabilir hızlı ve daha kolay bir yöntemdir. Sağlıklı kişilere ait 38 idrar örneğinden 22'sinde düşük oranlarda (0,012–0,046 ng/mL) olmak üzere OTA'ya rastlanmıştır. Karyomegalik intersitisiyel nefritli (KIN)'li 3 hastaya ait idrar örneklerinin tümünde en yüksek düzeyi 0,140 ng/mL olmak üzere OTA tespit edilmiştir.

Gilbert ve ark. (2001) tarafından diyetlerle OTA' ya maruziyetin değerlendirilmesi için insan kan plazması ile insan idrar örneklerinin analizlerinin kullanımını kapsayan bir araştırma düzenlenmiştir. 50 kişiden 30 günü aşkın bir süre ile paralel diyet örnekleri ile bu diyetleri kapsayan dönemdeki plazma ve idrar örnekleri toplanmış ve örnekler gıdalarda 0,001 ng/g, plazmada 0,001 ng/g ve idrarda 0,01 ng/ml düzeyde OTA 'yı ölçebilecek hassasiyette yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. 30 gün boyunca toplanan gıda örneklerinde OTA düzeyi 0,26–3,54 ng/kg (va)/gün (ortalama 0,94 medyan 0,76 ng/kg (va)/gün) aralığında tespit edilmiştir. Toplanan tüm plazma örnekleri ile 46 idrar örneğinde OTA' ya rastlanmıştır. OTA tüketimi ile idrardaki OTA konsantrasyonu (idrara salgılanan tüm OTA konsantrasyonu hesaplandığında) arasında belirgin bir korelasyona

rastlanırken, plazmadaki OTA konsantrasyonu ile tüketim arasında belirgin bir korelasyona rastlanmamıştır. Bu çalışma sonucu göstermiştir ki, OTA maruziyetinin değerlendirilebilmesi için idrar oldukça güvenilir ve kolay bir biyolojik belirleyicidir.

Fazekas ve ark. (2005) Macaristan' da 3 ilçedeki 5 yerleşim yerinden toplam 88 sağlıklı insandan topladıkları idrar örneklerindeki OTA içeriğini IAK temizleme ve HPLC dedeksiyon ile araştırmış ve birbirinden çok farklı sayılarda olmayan kadın ve erkek bireylerden topladıkları örneklerin % 61' inde ortalama 0,013 ng/ml (0,006–0,065 ng/mL aralığında değişen) OTA konsantrasyonu teşhis etmişlerdir. Heves ilçesinden toplanan idrar örneklerinde OTA konsantrasyonu, Hajdu-Bihar ve Somogy ilçelerinden toplanan örneklere oranla oldukça yüksek bulunmuştur ($p < 0,003$). Bu bölgesel farklılıklar Macaristan'da farklı bölgelerde yaşayan nüfusun farklı OTA konsantrasyonuna maruz kaldığını göstermiştir. Aynı zamanda bu çalışma kırsal nüfus dışında Macaristan halkının çoğunluğunda OTA alımının düşük olduğu sonucunu da ortaya çıkarmıştır (< 1 ng/kg (va) /gün).

Özçelik ve ark. (2001) tarafından Isparta bölgesinde 93 çeşitli böbrek hastalıklarına sahip ve 40 sağlıklı insandan alınan kan örnekleri ile yapılan bir çalışmada kanda OTA düzeyleri araştırılmıştır. 93 kan örneğinin 35'i hemodiyaliz tedavisi gören kronik böbrek yetmezliği, 28' i peritoneal diyaliz tedavisi gören kronik böbrek yetmezliği, 15'i mesane kanseri ve 15' i ise böbrek taşı hastalarına aittir. İnsan kan örneklerinde OTA floresan spektrum yöntemiyle ölçülmüştür. Sağlıklı insanlara ait kan örneklerindeki ortalama OTA değeri $0,4 \pm 0,28$ ng/mL bulunmuştur. En yüksek değer hemodiyaliz tedavisi gören böbrek hastalarında bulunan $2,1 \pm 1,2$ ng/mL değeri olmuştur. Tüm hastalara ait kan örneklerinde bulunan ortalama OTA değeri sağlıklı insanlara ait örneklere oranla yüksek bulunmuştur. Bu sonuç OTA' nın insanlardaki üriner patolojik durumlarda rol oynadığını düşündürebileceğini ileri sürmüştür.

Pena ve ark. (2006), kan örneklerinde OTA analizine göre daha iyi bir biyogösterge olan idrar örneklerinde OTA analizi için bir analiz yönteminin geçerlilik çalışmasını yapmış ve bu yöntemle Portekiz'in çeşitli şehirlerinden topladıkları insan idrar örneklerini OTA yönünden analiz etmişlerdir. % 5 NaHCO₃ ekstraksiyonu, immünaffinite temizleme ve floresans detektörlü HPLC aşamalarını içeren yöntemin teşhis limiti (LOQ) 0,02 ng/mL (ekstraktan 1,3 ng/mL enjeksiyon yapıldığında) OTA eklenmiş boş idrar örneklerinde ise geri kazanım oranı ise % 9 dan daha az RSD ile %90 olarak bulunmuştur. OTA' nın doğrulanması için metil ester türevlendirme yapılmıştır. Portekiz'in Coimbra şehrinde yaşayanlardan toplanan 60 idrar örneğinden 42'sinde LOQ üzerinde 0,021 ile 0,105 ng/mL arasında değişen değerlerde OTA' ya rastlanmıştır.

1.10. Çalışmanın Amacı

Çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen OTA hububatlar (başlıca buğday, arpa, yulaf, mısır), baharatlar, kurutulmuş meyveler, fasulye, kahve, süt, bira, şarapta bulunabilmekte ve bazı hayvan türlerinde nefrotoksik, hepatotoksik, karsinojenik, teratojenik, immünotoksik etki gösterirken, sıçanlarda ve farelerde ise karaciğer tümörlerine neden olmaktadır. Aynı zamanda başta güneydoğu Avrupa ülkelerinde görülen Balkan Endemik Nefropatileri (BEN), fatal böbrek hastalıkları, idrar yolları tümörlerine, Mısır ve Tunus'ta görülen ve etyolojisi tanımlanamayan nefropatilere neden olmaktadır. Uzun yarılanma ömrü nedeni ile (insanda yaklaşık 35 gün) OTA böbrek hastalarının ve sağlıklı insanların kanlarında farklı düzeylerde bulunabilmektedir.

Yaygın bir şekilde insan biyolojik sıvılarında bulunuyor olması kontamine gıdaların alınımıyla bu mikotoksine sürekli maruz kalındığına bir kanıt oluşturmaktadır. Yüksek toksisitesi nedeni ile insanlarda söz konusu bu toksine maruziyet ile ilgili araştırmalara yeterli önemin verilmesi gerekmektedir.

Bu araştırmada önemli toksik etkilere sahip olduğu çeşitli hayvan deneyleri ile geniş çapta ortaya konulmuş ancak insanlar üzerindeki etkileri ile ilgili yetersiz sayıda epidemiyolojik çalışma olan OTA'nın insan maruziyet verilerini elde etmek hedeflenmiştir. Pek çok gelişmiş ÷lkede insan vücut sıvılarında OTA düzeyleri ile ilgili çok sayıda çalışma düzenlenmiştir. Sözü geçen araştırma ile ÷lkemizde de OTA' ya maruziyetin araştırılması ve kontamine gıdalarla beslenen insanların vücutlarında bu toksinin en büyük atılım yolu olan idrardaki düzeylerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma, özellikle ÷lkemizde söz konusu toksine maruziyetin insan vücut sıvılarında ilk kez IAK temizleme, HPLC dedeksiyon ve LC/MS doğrulama gibi oldukça hassas bir yöntemle araştırılıyor olması açasından da önemlidir. Böylece riskli bölgelerin ortaya çıkarılması sonucu bu bölgelerde yapılacak olan ileri çalışmalarla sorunun kaynağı belirlenmiş olacaktır. Avrupa birliğine üyelik sürecine henüz girmiş olan ÷lkemiz açasından bu yönde bir araştırma Türkiye'deki mevcut durumu ortaya koymak açasından gereklilik arz etmektedir.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Deney Kurgusu

Çalışma esas olarak Türkiye’de çeşitli bölgelerdeki OTA’ ya maruziyetin araştırılmasını kapsamıştır. Bu amaçla Türkiye’ de 4 ayrı bölgeden farklı antropometrik özellikler ve yaşam tarzlarına sahip 245 gönüllüden daha konsantre olması nedeni ile sabah ilk idrar örnekleri toplanmıştır. Farklı atılım oranları nedeni ile spot idrar konsantrasyonları çeşitlilik gösterebilir, ancak düzeltme yapılarak ng/g kreatinin cinsinden ifade edilmesi 24 saatlik yerine spot idrar kullanabilmemizi sağlamıştır. Bu nedenle analitik çalışmalar sonucu örneklerde ng/mL düzeyinde elde edilen sonuçlar kreatinin cinsinden düzeltmeler yapılarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca örneklerin toplandığı her bölgede idrarları alınan bireylere aşağıda sunulan anket formundaki sorular yöneltilmiş bireysel farklılıkların ve yaşam kalitesinin maruziyete etkisini değerlendirebilmek açısından da bilgi edinilmiştir. Yine bu araştırma sonucu elde edilen veriler doğrultusunda OTA’ nın metabolizması üzerine etki eden ve deneklere uygulanacak olan anket soruları ile ortaya çıkabilecek bazı etkenler literatürdeki mevcut bilgiler ışığında değerlendirilmiştir. Böylece toksine maruziyetin etkileri ile yaşam tarzı ve bazı antropometrik özellikler arasında korelasyon oluşturulmaya çalışılmıştır.

2.2 Analiz Yöntemleri

2.2.1 İdrar Örneklerinin OTA Yönünden Analiz Edilmesi

2.2.1.1. Cihaz ve Malzemeler

- Genel laboratuvar alet ve malzemeleri,
- Santrifüj: 2000 dev/dk. sağlayabilen ve 50 ml hacmi santrifüj edebilen
- HPLC: Agilent 1100.binary pompa ve Agilent 1100 otomatik örnekleyici Agilent 1200 floresan dedektörü bulunan (değişebilir-dalga boyu eksitasyon ve emisyon imkanı olan) , 0,1–100 µl enjeksiyon yapılabilen özelliklerde.
- Otomatik pipetler: 10–100 µl ve 1001–1000 µl hacimde uçları bulunan,
- Vial: 2 – 6 ml'lik.
- HPLC kolonu: C18 Agilent Eclipse, 250x4,6mm, 5 µm
- Şırınga: Plastik, 50 ml hacimde
- 50 mL'lik ağzı kapaklı Falcon Tüpleri

2.2.1.2. Reaktifler

- Immuno-affinite kolon Ochratest™ Vicam L.P: (Watertown,MA,USA): Katı desteğe tutturulmuş monoklonal okratoksin A antikoları içeren
- Çözücüler: Asetonitril, metanol, benzen; kromatografik saflıkta (Merck Darmstadt, Germany)
- Mobil faz: Asetonitril-su-Asetik Asit (99+99+1) (V+V+V),
- % 5 lik NaHCO₃ çözeltisi (5 g NaHCO₃ 1000 mL bidistile saf suda çözülür)
- Enjeksiyon solventi (su+metanol+asetik asit 7+3+1 oranlarında)
- 50 ng/mL okratoksin A standardı (Supelco Inc. Bellefonte, PA)

2.2.1.3. İdrar Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması

Ankara, Diyarbakır, İstanbul ve İzmir olmak üzere Türkiye'nin dört farklı şehrindeki sağlıklı insanlardan toplanan idrar örnekleri tek kullanımlık plastik idrar kaplarında ve soğuk koşullarda laboratuvara taşınmış ve analize kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır. İnsan idrar örneklerinde beklenen OTA düzeyleri iz düzeylerde olduğu için hassas ve doğru bir yöntem seçimi büyük bir önem arz etmiştir. Bu nedenle genellikle floresans detektörlü ya da kütle spektrometrelili sıvı kromatografisi ve immünaffinite kolon-temizleme içeren yöntemler geniş çapta kullanılmaktadır (Valenta ve ark. 1998, Pascale ve ark. 2000, Fazekas ve ark. 2005, Pena ve ark. 2006). Bu nedenle Fazekas ve arkadaşlarına ait (2005) yöntem kullanılmış ancak yine performans çalışmaları sonucu aşağıda belirtilen ufak değişiklikler yapılmasına karar verilmiştir.

Değişiklikleri içeren analiz yöntemi aşağıda belirtilmiştir.

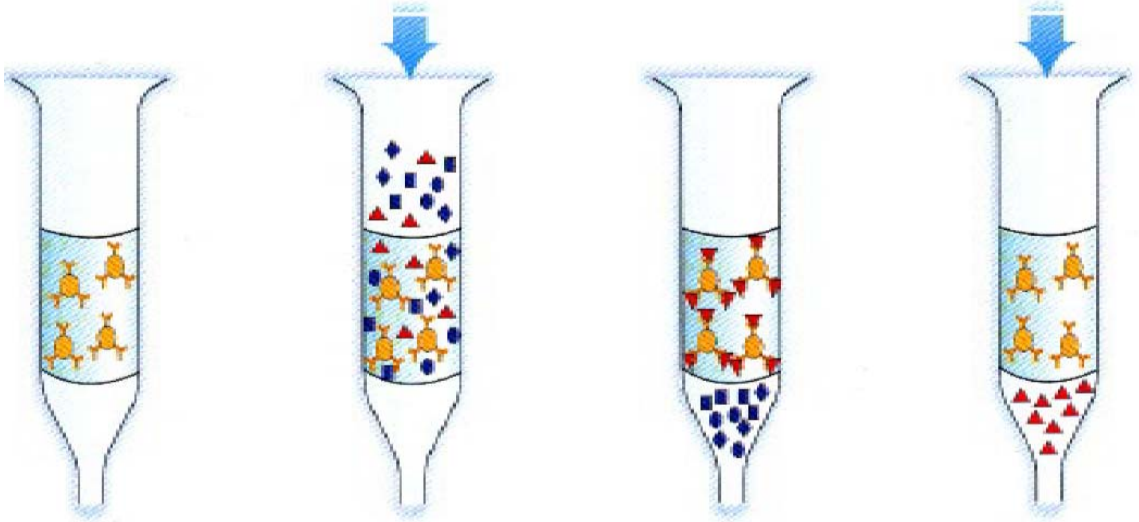
- 25 mL idrar örneği 25mL % 5'lik NaHCO₃ çözeltisi
- 50 mL'lik Falcon tüpleri içerisinde ultrasantrifüj cihazında 2000 dev/dak'da 5 dk süre ile santrifüj edilir.
- Santrifüj edilmiş ekstraktın üst kısmından 20 mL çözelti yaklaşık saniyede 1 damla hızla OchratestTM immunaffinite kolondan geçirilir.
- Daha sonra kolondan yine saniyede 1 damla hızla 1 kez 10 mL bidistile su geçirilir.
- 3 mL metanol ile kolondaki OTA bir vialle alınır.
- Vialle alınan eluat azot gazı altında evapore edilir.
- 1 mL HPLC enjeksiyon solventi ile yeniden çözülerek enjeksiyona kadar +4 °C'de saklanır

Okratoksin A Standart Çözeltileri: Anon. (1995)' deki gibi stok standart ve bundan da çeşitli konsantrasyonlarda bir seri analiz standartları hazırlanır. Ancak analiz standartları, stok standarttan ayrılan belli bir miktarın azot gazı

altında kuruduktan sonra, enjeksiyon solventi içerisinde çözülmesiyle hazırlanır.

2.2.1.4. İmmünoafinite Kolon (IAK) Çalışma Prensibi

- A. Immunoaffinity kolonlar özel bir monoklonal antikor içerir
- B. Mikotoksin içeren örnek ya da örnek ekstraktı kolondan geçirilir
- C. Antikor izole halde kalır, mikotoksinler kolonda tutulur
- D. Geçen eluent kolonda antikoru denatüre eder, toksinler elusyon çözücüsüne geçer, kromatografik yöntemlerle toksin tayini yapılır.



Şekil.2.1. IAK çalışma prensibi

2.2.1.5. HPLC koşulları

- HPLC mobil faz: su - asetoneitril – asetik asit
(99+99+2)(V+V+V)
- Akış hızı: 1 mL/dk (Akış hızı 1 mL/dk olarak değiştirilmiştir)

- Dalga boyu: eksitasyon: 333 nm emisyon: 477 (veya 460) nm (deneyerek en yüksek ve düzgün pikin elde edildiği dalga boyu seçilir)
- Enjeksiyon hacmi: 100 µL
- Kolon sıcaklığı: 43°C
- Değerlendirme;
- Hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki standartlar (en az 5 nokta olmalıdır) HPLC' ye enjekte edilir. Okratoksin A miktarına karşılık elde edilen pik yüksekliklerine (veya alanına) göre kalibrasyon grafiği çizilir.
- Numune ekstraktından da enjeksiyon yapılır ve numune kromatogramındaki piklerle, standart pikinin alıkonma zamanı karşılaştırılır.
- Numunede toksin olduğuna karar verilmesi durumunda, standart grafikten enjekte edilen numunedeki Okratoksin A miktarı bulunur.
- Numune ekstraktına ait pik, en yüksek standarda ait pikten yüksekse, numune asetonitrille seyreltilip, enjeksiyon tekrarlanır.

LC kolonuna enjekte edilmiş bölümlere ayrılmış test solüsyonlarındaki ng cinsinden OTA kütleleri, kalibrasyon grafiklerinden hesaplanır. MA eşitlikte kullanılan mg/kg OTA'nın kütle oranı hesaplanır (W_{OTA})

$$W_{OTA} = (M_A) \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{V_3}{V_4} \times \frac{1000}{M_S} \times \frac{1}{1000}$$

M_A = Test ekstraksiyon solventindeki OTA'nın kütlesi, ng

V_1 = Ekstraksiyon solventi, mL(20)

V_2 = IAK'dan geçirilen metanol: su, mL(10mL)

V_3 = Test Solüsyonu(120 mL)

V_4 = Enjekte edilen test solüsyonu, mL

1000 = g' ı kg' a dönüştürme faktörü

1000^{-1} = ng' ı g' a dönüştürme faktörü

2.2.2 Validasyon Çalışması

Yöntem validasyonu kimyasal analiz uygulamalarında önemli bir gerekliliktir. ISO tarafından yöntem validasyonu, kullanılmakta olan yöntemin, performansının uygulamadaki gereklilikleri için uygun olup olmadığının doğrulanması olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada analiz yönteminin laboratuvar içi geçerliliğini ortaya koyabilmek için gerçeklik, kesinlik, seçicilik, tanımlama, ölçüm limiti ve doğrusalılık ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Bunun için daha önceden analiz edilmiş ve içerisinde OTA bulundurmayan boş idrar örneklerine belli düzeylerde OTA standart solüsyonlarından eklemeler yapılmıştır. Ekleme yapılmış (spiked) idrar örnekleri ile doğal kontamine idrar örnekleri OTA için paralelli olarak yukarıda belirtilmiş olan yöntem kullanılarak analiz edilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılacak düzeyler belirlenirken, daha önce yapılmış çalışmalarda rastlanmış olan OTA düzeylerine yakın olmaları dikkate alınmıştır.

2.2.3 Numunelerin Toplanması ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Türkiye'nin bölgesel farklılıklara sahip (başta beslenme alışkanlığı olmak üzere, farklı iklim, farklı kültür ve ekonomik yapıya sahip) 4 ayrı şehirden (İstanbul, Ankara, İzmir ve Diyarbakır) insan idrar örnekleri OTA yönünden analiz edilebilmesi için toplanmıştır. Bu nedenle Diyarbakır'dan 46, İzmir'den 47, İstanbul'dan 61 ve Ankara'dan 81 olmak üzere farklı özelliklere sahip toplam 245 kadın ve erkek bireylerden numune toplanmış ve toplanan tüm örnekler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji

Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında OTA ve kreatinin bakımından analiz edilmiştir. Ayrıca idrar örneklerinin toplanması sırasında katılımcılar arasındaki bireysel farklılıkları ortaya koymak ve toksine maruziyet ile ilişkilendirebilmek amacı ile gönüllülere ekte verilen anket formundaki sorular yöneltilmiş ve elde edilen bilgiler değerlendirilmiştir.

2.2.4 Toplanan İnsan İdrar Örneklerinin Kreatinin Analizleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Farklı atılım oranları nedeni ile spot idrar konsantrasyonları çeşitlilik gösterebilir, ancak düzeltme yapılarak ng/g kreatinin cinsinden ifade edilmesi 24 saatlik yerine spot idrar kullanabilmemizi sağlamıştır (Schierl 2000). Bu nedenle, ikinci dönemde OTA bakımından analiz edilen insan idrar örneklerinden HPLC yöntemiyle tespit edilen ng/mL cinsinden sonuçlar, spektrofotometre ile ölçülen kreatinin miktarları göz önünde bulundurularak düzeltilmiş ve ng/g kreatinin cinsinden ifade edilmiştir.

2.2.4.1. Analiz Yöntemi

- Tüm idrarlar bir gün önceden – 20 °C den çıkarılıp + 4 °C ye buzları çözülünceye kadar bekletilir.
- 2 mL idrar alınıp 3000 rpm de 15 dk süre ile santrifüj edilir.
- Santrifüj edilen idrardan 50µL alınıp su ile 5 mL'ye tamamlanır (seyreltme faktörü =100)
- 5 mL seyreltilmiş idrar 2,5 mL pikrik asit ve 0,5 mL % 10' luk NaOH ile 10 dk girdap karıştırıcıda karıştırılır.
- Spektrofotometrede okunur. Kalibrasyon eğrisinden miktar hesaplanır.

Yukarıda verilen analiz yöntemi kullanılarak yapılan analizler sonucu elde edilen kreatinin değerlerinin; Diyarbakır'dan toplanan örneklerde 0,08 g/l ile 5,48 g/L, İzmir'den toplanan örneklerde 0,34 g/L ile 4,94 g/L İstanbul'dan

toplanan örneklerde 0,26 g/L ile 6,19 g/L Ankara'dan toplanan örneklerde ise 0,22 g/L ile 5,7 g/L arasında değiştiği görülmüştür. Kreatinin değerleri 0,5 g /L ile 3 g/L arasında bulunan insan idrar örneklerinin biyolojik izlemelerde düzeltme yapılabilir. 4 ilden toplanan örneklerin yaklaşık %90'ında kreatinin değerlerinin günlük atılan madde konsantrasyonunda düzeltme yapılabilecek oranlarda olduğu görülmüştür.

2.2.5 LC/MS ile Doğrulma

İdrar örneklerinde OTA varlığının ve düzeylerinin belirlenmesi çalışması için spesifik antibody içeren monoklonal immünoaffinite kolonlar kullanılmış ve teşhis ve tespit için kromatografik yöntemler ile elde edilen maddenin seçicilik, doğruluk, kesinlik gibi detaylı geçerlilik işlemleri yapılmış olmasına rağmen LC/MS ile doğrulama yapabilme tekniği kullanımına da gidilmiştir. Bunun için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez laboratuvarında bulunan Waters Marka LC/MS cihazı kullanılmıştır.

2.2.5.1. Analiz Yöntemi

Bu uygulama için analiz yönteminde LC/MS koşullarına daha uygun eluat eldesi amacıyla ufak bazı değişiklikler yapılmış. Analiz örnekleri bu yöntemle yeniden çalışılmıştır. OTA analizleri için kullanılmış olan yöntem Shephard ve ark. (2003) tarafından kullanılmış olan yöntemdeki gibi LC/MS şartlarına uygun hale getirilmiştir. Buna göre yöntem aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- 25 mL idrar örneği 25 % 5'lik NaHCO₃ çözeltisi
- 50 mL'lik Falcon tüpleri içerisinde ultrasantrifüj cihazında 2000 dev/dak'da 5 dk süre ile santrifüj edilir.
- Santrifüj edilmiş ekstraktın üst kısmından 40 mL çözelti yaklaşık saniyede 1 damla hızla OchratestTM immünaffinite kolondan geçirilir.
- Daha sonra kolondan yine saniyede 1 damla hızla 1 kez 10 mL bidistile su geçirilir.

- 3 mL metanol ile kolondaki OTA bir vialle alınır.
- Vialle alınan eluat azot gazı altında evapore edilir.
- 300 µL su+asetonitril+formik asit (26+74+0,1) (V+V+V) ile yeniden çözülerek enjeksiyona kadar +4 °C'de saklanır.

2.2.5.2. LC/MS koşulları

HPLC analizi için Waters Alliance 2695 sistemi (Gradient pompa, otoenjektör ve kolon fırını (40 °C) İsookratik ters-faz HPLC 0,8 mL/min (%35 metanol, %60 asetonitril, % 5 0,1 FA Su) 250–4,6mm–5µ -C18 kolon (Zorbax Eclips XDB Agilent Technologies) kullanılmıştır. Kütle analizleri için ise Waters marka ZQ model kütle spektrometresi pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) modunda kullanılmıştır. MS parametreleri OTA standardı kullanılarak (1g/mL) MS dedektör ayarlanması ile optimize edilmiştir (tuning). Önce scan modunda 100–1000 amu aralığında tarama yapılarak 404,4 m/z iyonu tespit edilip miktarsal doğrulama için SIR (tekli iyon kaydı) modu kullanılmıştır. Analizler sırasında MS parametreleri capillary 3,8 kV, cone 25 volt, extractor 2 volt, source temp 120 °C, desolvation temp 350 °C, desolvation gas 550 ml/min, Low&High Resolution 15, Iyon energy 1 0,5 multiplier 650 volt olarak kullanılmıştır.

2.2.6 İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen ng/g kreatinin cinsinden OTA değerleri, anket sorularına verilen cevaplar sonucu elde edilen bilgiler doğrultusunda, istatistiksel olarak one way ANOVA, student t test ve çoklu korelasyon yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir: İstatistiki değerlendirmeler için “SPSS 13.0 for Windows” istatistik paket programından yararlanılmıştır.

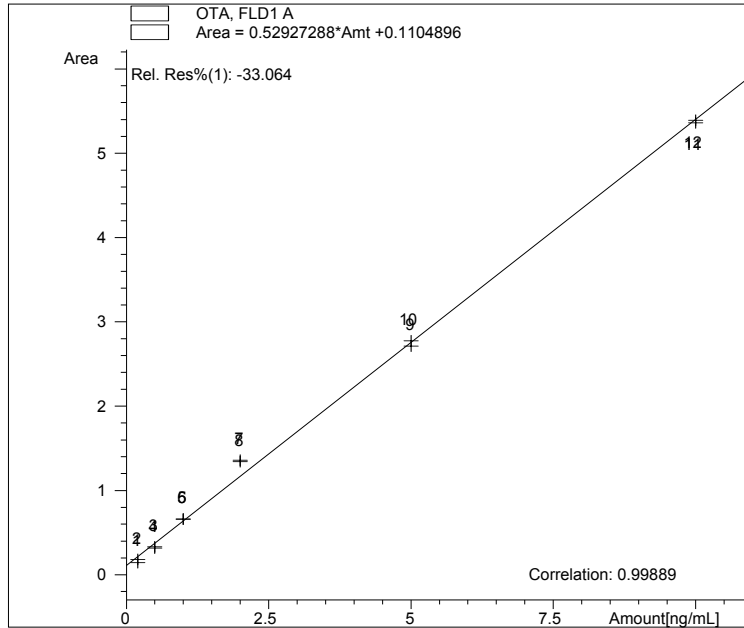
3.BULGULAR

3.1. Yöntem Validasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

4 aşamalı olarak sürdürülen çalışmanın ilk aşamasındaki idrar örneklerindeki OTA varlığının ve düzeylerinin belirlenebilmesi için kullanılacak yöntemin geçerliğini ortaya koyacak olan doğrusallık, seçicilik, tanımlama ve ölçüm limiti, kesinlik, gerçeklik gibi parametreleri içeren yöntem validasyon çalışmasına ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Doğrusallık (Linearity)

6 ayrı konsantrasyonda hazırlanan standartlardan HPLC cihazına 2'şer enjeksiyon yapılmış ve bu konsantrasyondaki okratoksin A'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.1).

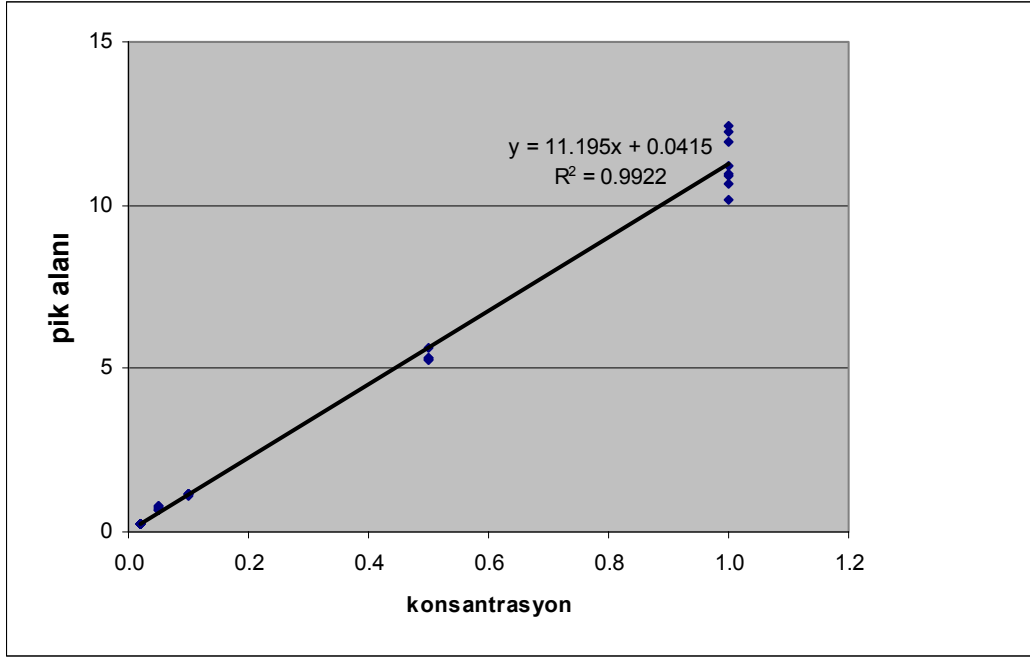


Şekil 3.1. OTA'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi

Ayrıca, 5 farklı düzeyde OTA standardı eklenmiş olan idrar örneklerinde (spiked samples) ikişer paralelli olarak yapılan analizlerde elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyon Çizelge 3.1 ve Şekil 3.2 görülmektedir.

Çizelge 3.1. OTA eklenmiş idrar örneklerinde yapılan analizlerden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyon bulguları.

Doğrusallık					
OTA ekleme düzeyi (ng/mL)	Par. no.	Elde edilen alan	OTA ekleme düzeyi (ng/mL)	Par. no.	Elde edilen alan
0,02	1	0,2532	0,5	1	5,3446
	2	0,2707		2	5,2692
	3	0,2656		3	5,6435
	4	0,2534		4	5,3351
	5	0,2665		5	5,2944
	6	0,2294		1	10,1789
	7	0,2284		2	10,8765
	8	0,2262		3	11,2309
0,05	1	0,6680	1,0	4	12,2445
	2	0,6761		5	10,9683
	3	0,6641		6	10,6255
	4	0,7421		7	12,4526
	5	0,7829		8	11,9367
	6	0,7543			
	7	0,7780			
	0,1	1		1,1270	Korelasyon katsayısı
2		1,1707			
3		1,1394			
4		1,1885			
5		1,1441			



Şekil 3.2. OTA eklenmiş idrar örneklerinde yapılan analizlerden elde edilen alan ile konsantrasyon arasındaki korelasyonu gösteren grafik

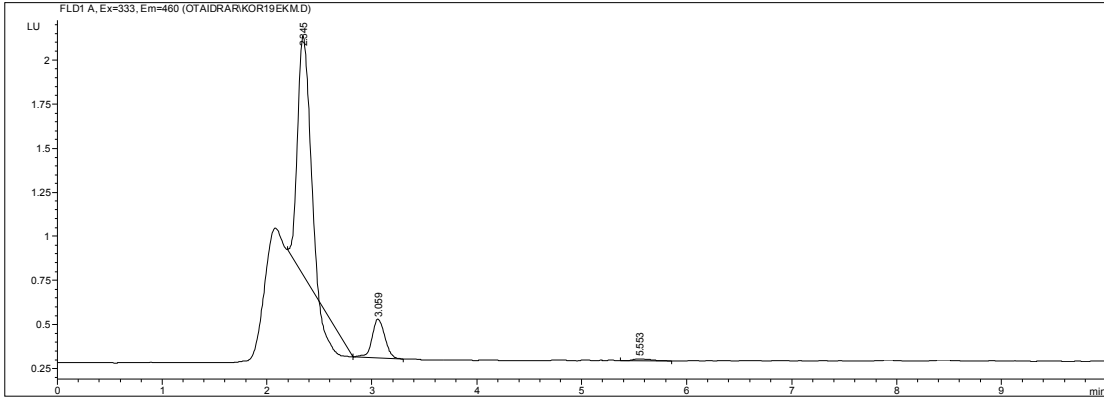
Okratoksin A'ya ait elde edilen regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı aşağıda verilmiştir:

$$y = 1,195x + 0,0415$$

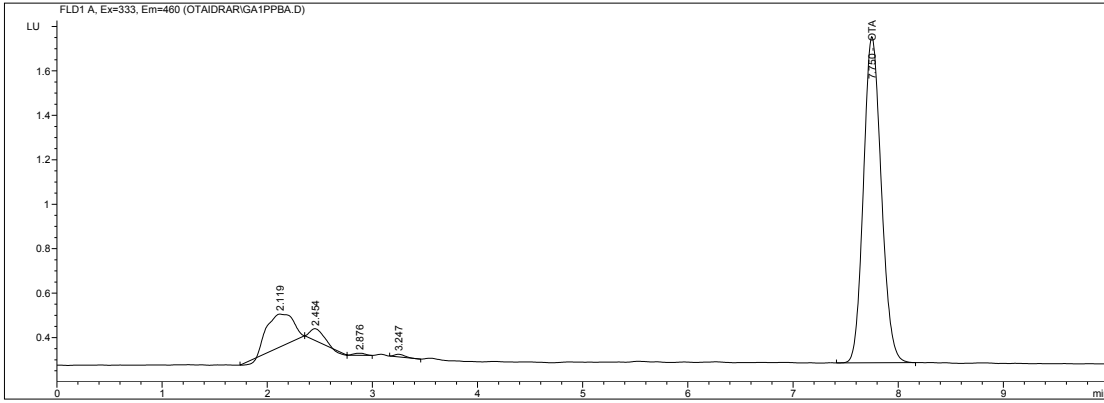
$$r = 0,9922$$

3.1.2. Seçicilik (Selectivity)

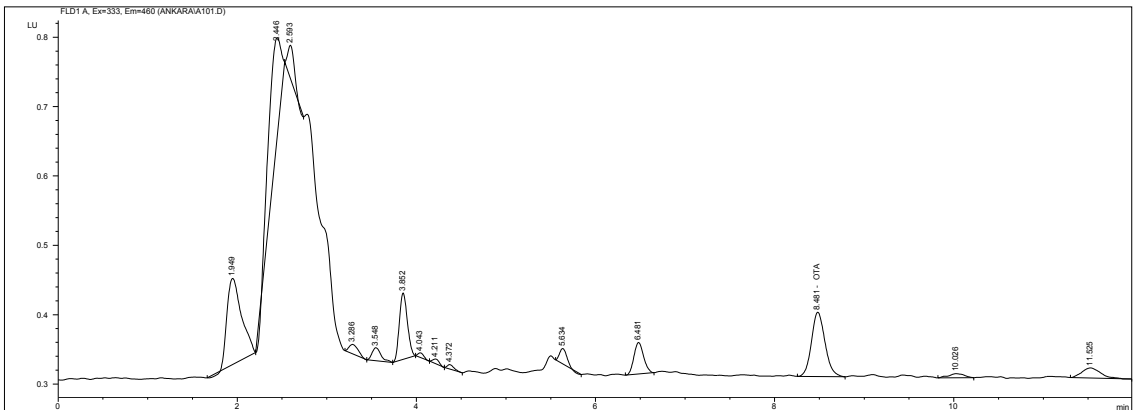
İçersinde okratoksin A bulunmayan insan idrar örneklerine ait kromatogram ve içersine okratoksin A eklenmiş olan aynı örneklere ait kromatogramlar incelenmiş; boş örnekte OTA piki ile yakın alıkonma zamanlarında çıkan herhangi bir pik olmadığı görülmüştür (Şekil 3.3, 3.4). Farklı bir tarihte enjeksiyonu yapılan 0,074 ng/mL düzeyinde doğal kontamine örneğe ait kromatogram Şekil 3.5' da görülmektedir.



Şekil 3.3. İçerisinde OTA bulunmayan boş insan idrar örneği



Şekil 3.4. 1 ng/mL düzeyinde OTA eklenmiş idrar örneğinin HPLC' ye enjeksiyonundan elde edilen kromatogram



Şekil 3.5. 0,074 ng/mL düzeyinde doğal kontamine idrar örneğine ait kromatogram

3.1.3. Tanımlama ve Ölçüm (Rapor) Limiti (LOD ve LOQ)

Daha önce çok düşük düzeyde okratoksin A içerdiği belirlenmiş olan bir idrar örneği, on üç paralel olarak analiz edilmiş; elde edilen değerlerin ortalaması ve standart sapması hesaplanmış ve ortalama + 3*standart sapma LOD olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlar Çizelge 3.2 de görülmektedir.

Çizelge 3.2. Tanımlama ve ölçüm limiti çalışmasına ait elde edilen değerler

Tanımlama ve ölçüm limiti			
Paralel no.	Ölçülen değer	Paralel no.	Ölçülen değer
1	0,0041	8	0,0041
2	0,0053	9	0,0039
3	0,0054	10	0,0030
4	0,0042	11	0,0035
5	0,0034	12	0,0040
6	0,0034	13	0,0038
7	0,0037		
Ortalama			0,0040
Standart sapma			0,0007
Tanımlama limiti - LOD			0,006
Ölçüm limiti - LOQ			0,018

3.1.4. Kesinlik (Precision) :

Okratoksin A içermediği bilinen bir numuneye okratoksin A eklenerek (spiked samples) 5 konsantrasyonda hazırlanan numuneler ve bir de doğal kontamine numune tekrarlanabilirlik koşullarında 6–9 paralel analiz edilmiş ve paraleller arasındaki ortalama, standart sapma ve RSD değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait elde edilen değerler

Par. no.	Tekrarlanabilirlik					Doğal kontamine
	Ekleme düzeyi (ng/mL)					
	1,0	0,5	0,1	0,05	0,02	
1	0,7814	0,4101	0,0862	0,0510	0,0191	0,0034
2	0,8350	0,4043	0,0899	0,0516	0,0205	0,0034
3	0,8622	0,4331	0,0872	0,0507	0,0201	0,0037
4	0,9400	0,4094	0,0910	0,0567	0,0211	0,0041
5	0,8420	0,4063	0,0875	0,0598	0,0192	0,0039
6	0,8157	0,4344	0,0745	0,0576	0,0202	0,0030
7	0,9560			0,0594		0,0035
8	1,0260					0,0040
9	0,9166					0,0038
ort	0,8861	0,4163	0,0860	0,0553	0,0200	0,0036
ss	0,0785	0,0137	0,0059	0,0040	0,0008	0,0004
RSD (%)	8,86	3,29	6,91	7,32	3,83	9,89

Horwitz eşitliğinden ($2^{(1-0,5\log c)}$) hesaplanan ve EC 401/2006 Yönetmeliği'nde (EC, 2006) verilen OTA için kabul edilebilir RSD_r değerleri Çizelge 3.4.' te görülmektedir.

Çizelge 3.4. EC 401/2006 direktifine göre OTA için kabul edilebilir RSD_r değerleri

OTA için kabul edilebilir maks. RSD _r değerleri		
kons.(ppb)	EC 401/2006	2002/25 (Horwitz)
<1	≤40	≤30
1-10	≤20	≤20-30

3.1.5. Gerçeklik (Trueness)

5 farklı konsantrasyon düzeyinde yapılan geri alma çalışmalarında yüzde geri alma (recovery) değerleri hesaplanmıştır. Bulunan değerler Çizelge 3.5' te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Gerçeklik çalışmasına ait elde edilen değerler

Ekleme düzeyi (ng/mL)	Gerçeklik									
	1,0		0,5		0,1		0,05		0,02	
1	0,7814	78,1	0,4101	82,0	0,0862	86,2	0,0510	102,0	0,0191	95,7
2	0,8350	83,5	0,4043	80,9	0,0899	89,9	0,0516	103,2	0,0205	102,4
3	0,8622	86,2	0,4331	86,6	0,0872	87,2	0,0507	101,4	0,0201	100,4
4	0,9400	94,0	0,4094	81,9	0,0910	91,0	0,0567	113,4	0,0211	105,7
5	0,8420	84,2	0,4063	81,3	0,0875	87,5	0,0598	119,6	0,0192	95,9
6	0,8157	81,6	0,4344	86,9	0,0745	74,5	0,0576	115,2	0,0202	100,8
7	0,9560	95,6	0,5263	105,3	0,0987	98,7	0,0594	118,9		
8	1,0260	102,6	0,5423	108,5	0,0509	50,9				
9	0,9166	91,7	0,5229	104,6	0,0944	94,4				
10			0,5219	104,4	0,0976	97,6				
11			0,4547	90,9						
12			0,4863	97,3						
% geri alma ort.		88,6		92,5		85,7		110,5		100,1

EC 401/2006 Yönetmeliği'nde (EC, 2006) verilen OTA için kabul edilebilir geri alma yüzdeleri Çizelge 3.6'da görülmektedir. Yöntemin validasyon çalışmasına ait sonuçların uluslar arası yöntem geçerliliği kurallarına göre uygun oluşu görülmüştür.

Çizelge 3.6. EC 401/2006 direktifine göre OTA için kabul edilebilir geri alma oranları (%)

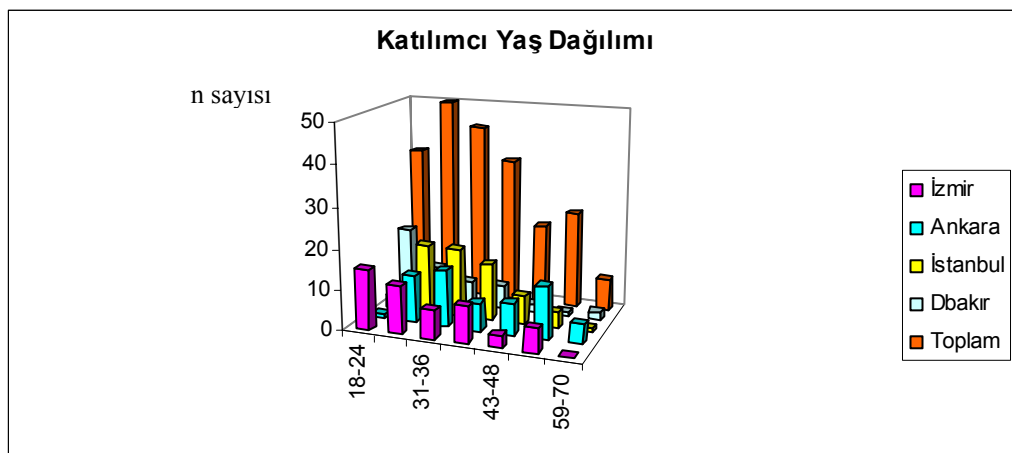
OTA için kabul edilebilir geri alma (%)	
kons.(ng/mL)	EC 401/2006
<1	50 – 120
1–10	70 – 110

3.2. Örneklerin Toplanması Sırasında Uygulanan Anket Sonuçlarının Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Çalışmanın ikinci aşamasında daha önceden belirlenmiş olan ve Türkiye’de farklı beslenme alışkanlıkları ve iklimsel özelliklere sahip 4 ilden örneklerin toplanması sırasında gönüllülere uygulanan anketlerden elde edilen sonuçlara göre maruziyetin değerlendirilmesi açısından önemli olan bazı sosyal ve antropometrik özellikler aşağıdaki gibi bir dağılım göstermiştir.

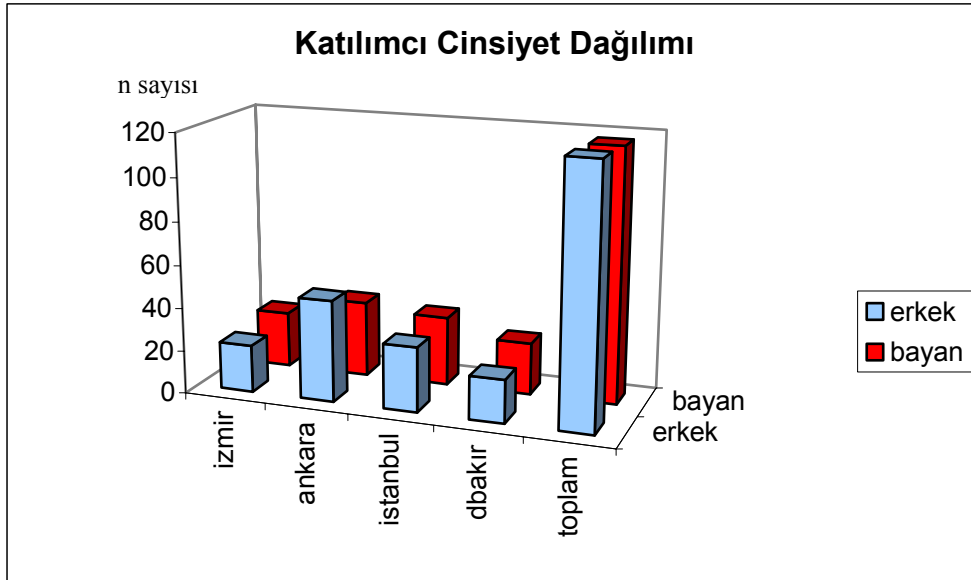
3.2.1. Katılımcı Yaş Dağılımı

Çalışmaya en yüksek oranda 25–30 yaş grubu arasındaki bireyler katılmıştır. Ancak daha önce etik kurul kararında da belirtilmiş olduğu gibi 18–70 arasındaki tüm gönüllülerden analiz için idrar örneği toplanmıştır. İller arasında yaş dağılımını gösteren grafik Şekil 3.6’ da görülmektedir.

**Şekil 3.6.** Katılımcılara ait yaş dağılım grafiği

3.2.2. Katılımcı Cinsiyet Dağılımı

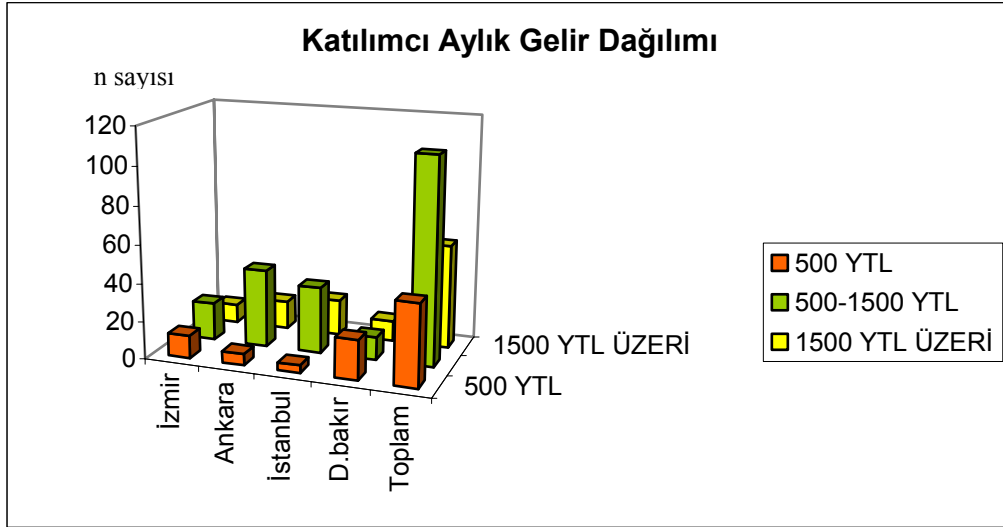
Toplam katılımcılar arasında erkekler yaklaşık %48, bayanlar ise yaklaşık % 52 oranındadır (Şekil 3.7) .



Şekil 3.7. Katılımcılara ait cinsiyet dağılım grafiği

3.2.3. Katılımcı Aylık Gelir Dağılımı

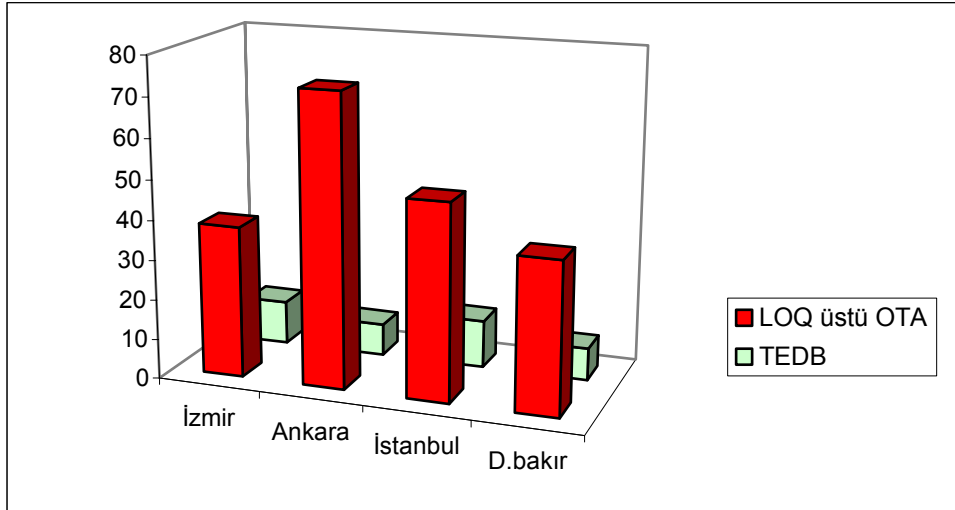
Türkiye genelinde çalışmaya katılan gönüllere ait aylık gelir durumu değerlendirildiğinde en yüksek oranda 500–1500 YTL aylık gelire sahip bireylerin bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.8).



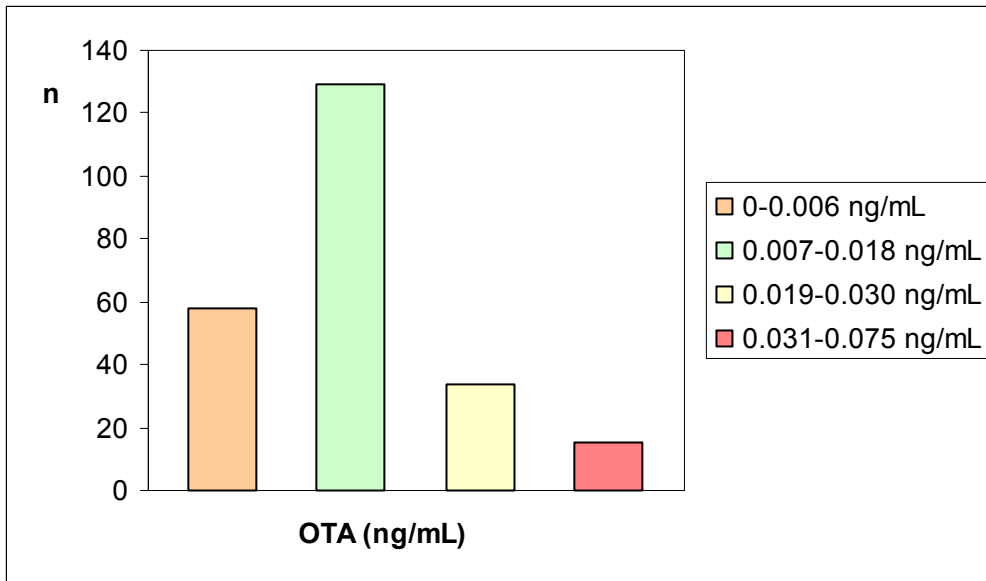
Şekil 3.8. Katılımcılara ait aylık gelir dağılım grafiği

3.3. Spot İdrar Örneklerinde OTA Analizleri ile İlgili Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

Diyarbakır, İzmir, İstanbul ve Ankara'dan toplanan insan idrar örnekleri, performans çalışması tamamlanmış olan OTA analiz yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Spot idrar örneklerinde yapılan analiz sonuçlarına göre; Diyarbakır'dan toplanan 46 örnekten 38'inde tanımlama limit olan (LOD) 0,006 ng/mL ile 0,030 ng/mL, İzmir'den toplanan 47 örnekten 36' sında tanımlama limit olan (LOD) 0,006 ng/mL ile 0,075 ng/mL, İstanbul'dan toplanan 61 örnekten 49'unda tanımlama limit olan (LOD) 0,006 ng/mL ile 0,040 ng/mL ve Ankara'dan toplanan 81 örnekten 73'ünde tanımlama limiti olan (LOD) 0,006 ng/mL ile 0,075 ng/mL arasında OTA'ya rastlanmıştır. Şekil 3.9'da il bazında ve toplam illere ait LOD ve üzerindeki düzeylerde OTA'ya rastlanan ve Tespit Edilebilir Düzeyde Bulunmayan (TEDB) bireylerin sayıları görülmektedir.



Şekil 3.9. İl bazında ve toplam illere ait LOD ve üzerindeki düzeylerde OTA'ya rastlanan ve TEDB bireylerin sayıları



Şekil 3.10. Türkiye genelinde toplanan idrar örneklerindeki OTA (ng/mL) konsantrasyon aralıkları

En yüksek düzeyde OTA'ya yaklaşık 0,075 ng/mL düzeyinde olmak üzere Ankara ve İzmir illerinde rastlanmıştır (Şekil 3.10).

3.4. Kreatinin Tayini ile İdrarda OTA Hesaplanması

Spot idrar örneklerinden elde edilen ng/mL OTA değerleri, her bir örnek için kreatinin tayininden elde edilen değerler kullanılarak hesaplanmıştır. İllere göre ortalama ng/g kreatinin değerleri Tablo 3.7' de gösterilmektedir. Buna göre en yüksek ortalama OTA değerine $12,93 \pm 1,41$ ile Ankara'da, en düşük ortalama OTA değerine ise $5,65 \pm 0,705$ ile İstanbul ilinde rastlanmıştır.

Çizelge 3.7. Bölgeler arası ortalama idrar OTA düzeyleri (ng OTA/g kreatinin)

Bölge	n	Ort \pm S.H.
Ankara	77	12.93 ± 1.41
Diyarbakır	46	9.07 ± 1.00
İstanbul	62	5.65 ± 0.70
İzmir	48	9.09 ± 1.14

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Her bir bölgede cinsiyet, sigara kullanımı, alkol kullanımı kahve tüketimi beslenme alışkanlığı ve yaşın idrardaki OTA miktarı üzerine etkisi Student t-testi ile araştırılmış ve sonuçlar tabloda belirtilmiştir (Çizelge 3.8, 3.9, 3.10 ve 3.11).

Çizelge 3.8. Ankara bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi

Faktör	n	OTA düzeyi (Ort. \pm S.H) ng/g kreatinin	p değeri
Yaş			
< 35	41	12.10 \pm 1.49	0.534
> 35	36	13.87 \pm 2.51	
Cinsiyet			
Kadın	32	13.75 \pm 2.77	0.628
Erkek	45	13.26 \pm 1.43	
Sigara kullanımı			
Evet	30	12.63 \pm 1.64	0.834
Hayır	45	13.26 \pm 2.16	
Alkol kullanım			
Evet	22	8.93 \pm 1.60	0.072
Hayır	54	14.61 \pm 1.86	
Kahve içimi			
Evet	37	11.36 \pm 2.19	0.276
Hayır	39	14.49 \pm 1.84	
Beslenme alışkanlığı			
Kuru gıdasız	72	13.29 \pm 1.50	0.332
Kuru gıdalı	5	7.69 \pm 1.11	

Çizelge 3.9. Diyarbakır bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi

Faktör	n	OTA düzeyi (Ort. \pm S.H) ng/g kreatinin	p değeri
Yaş			
< 35	34	9.07 \pm 1.18	0.992
> 35	12	9.05 \pm 9.05	
Cinsiyet			
Kadın	19	10.20 \pm 1.77	0.351
Erkek	27	8.27 \pm 1.16	
Sigara kullanımı			
Evet	22	9,24 \pm 1.30	0.868
Hayır	24	8.90 \pm 1.53	
Alkol kullanımı			
Evet	14	8.29 \pm 1.34	0.612
Hayır	32	9.41 \pm 1.32	
Kahve içimi			
Evet	27	9.73 \pm 1.26	0.436
Hayır	19	8.12 \pm 1.65	
Beslenme alışkanlığı			
Kuru gıdasız	35	8.82 \pm 1.16	0.670
Kuru gıdalı	11	9.84 \pm 2.06	

Çizelge 3.10. İstanbul bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi

Faktör	n	OTA düzeyi (Ort. \pm S.H) ng/g kreatinin	p değeri
Yaş			
< 35	32	5.11 \pm 1.00	0.427
> 35	30	6.24 \pm 0.99	
Cinsiyet			
Kadın	32	6.79 \pm 1.21	0.096
Erkek	30	4.44 \pm 0.62	
Sigara kullanımı			
Evet	24	4.43 \pm 0.79	0.170
Hayır	38	6.42 \pm 1.02	
Alkol kullanımı			
Evet	18	6.58 \pm 1.49	0.407
Hayır	44	5.27 \pm 0.78	
Kahve içimi			
Evet	40	6.28 \pm 1.06	0.430
Hayır	22	4.44 \pm 0.62	
Beslenme alışkanlığı			
Kuru gıdasız	57	5.90 \pm 0.75	0.234
Kuru gıdalı	5	2.80 \pm 1.20	

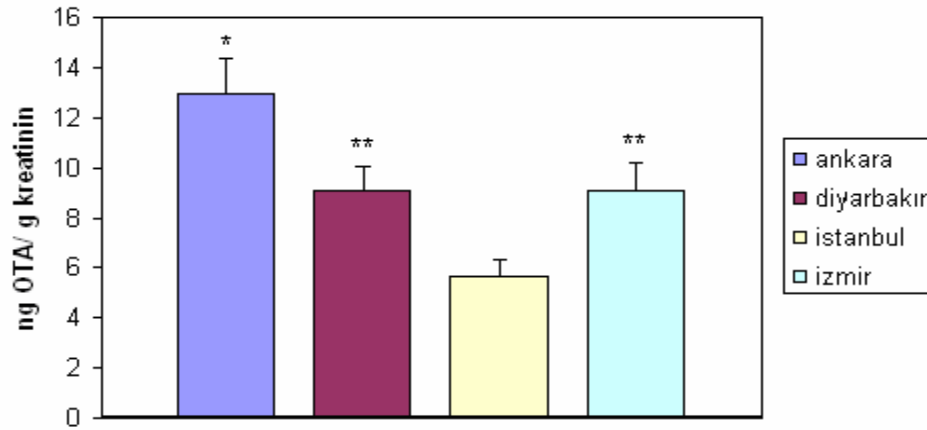
Çizelge 3.11. İzmir bölgesinden toplanan idrarlarda OTA düzeylerine etki edebilecek faktörlerin analizi

Faktör	n	OTA düzeyi (Ort. \pm S.H) ng/g kreatinin	p değeri
Yaş			
< 35	27	9.51 \pm 1.36	0.682
> 35	21	8.55 \pm 1.98	
Cinsiyet			
Kadın	25	9.68 \pm 1.41	0.094
Erkek	23	8.44 \pm 1.86	
Sigara kullanımı			
Evet	11	11.43 \pm 3.55	0.271
Hayır	37	8.39 \pm 1.06	
Alkol kullanımı			
Evet	21	6.55 \pm 1.57	0.050
Hayır	27	11.06 \pm 1.55	
Kahve içimi			
Evet	36	10.10 \pm 1.46	0.257
Hayır	12	5.84 \pm 1.31	
Beslenme alışkanlığı			
Kuru gıdasız	42	8.62 \pm 1.10	0.283
Kuru gıdalı	6	12.28 \pm 5.15	

OTA değerleri, yaş, cinsiyet, sigara, alkol, kahve tüketimi ile beslenmede kurutulmuş gıda tüketimi ve bölgeler arasındaki, Pearson korelasyonu ile çoklu analiz edilmiş ve bulunan sonuçlar Çizelge 3.12'de verilmiştir. Buna göre OTA' ya maruziyet ile bölgeler arasında anlamlı bir korelasyon görülmektedir.

Çizelge 3.12. Elde edilen ng OTA/g kreatinin miktarlarının etki edebilecek (confounding) faktörler ile çoklu korelasyonu

	OTA	Yaş	Cinsiyet	Sigara kullanımı	Alkol kullanımı	Kahve içimi	Beslenme alışkanlığı	Bölge (4 Bölge)
OTA p değeri	1	0.037 0.575	-0.068 0.304	-0.006 0.926	-0.137 0.038	-0.022 0.737	-0.028 0.666	-0.216 0.001
Yaş p değeri	0.037 0.575	1	-0.050 0.450	-0.022 0.735	0.053 0.417	0.021 0.749	0.086 0.193	-0.092 0.162
Cinsiyet p değeri	-0.068 0.304	-0.050 0.450	1	0.263 0.000	0.257 0.000	-0.148 0.024	-0.040 0.544	-0.094 0.153
Sigara kullanımı p değeri n	-0.006 0.926 231	-0.022 0.735 231	0.263 0.000 231	1 231	0.110 0.096 231	-0.022 0.739 231	0.107 0.106 231	-0.120 0.069 231
Alkol kullanımı p değeri	-0.137 0.038	0.053 0.417	0.257 0.000	0.110 0.096	1 231	0.195 0.003	-0.050 0.451	0.093 0.158
Kahve içimi p değeri	-0.022 0.737	0.021 0.749	-0.148 0.024	-0.022 0.739	0.195 0.003	1 232	-0.053 0.425	0.181 0.006
Beslenme alışkanlığı p değeri	-0.028 0.666	0.086 0.193	-0.040 0.544	0.107 0.106	-0.050 0.451	-0.053 0.425	1 233	0.031 0.641
Bölge (4 Bölge) p değeri n	-0.216 0.001 233	-0.092 0.162 233	-0.094 0.153 233	-0.120 0.069 231	0.093 0.158 232	0.181 0.006 232	0.031 0.641 233	1 233



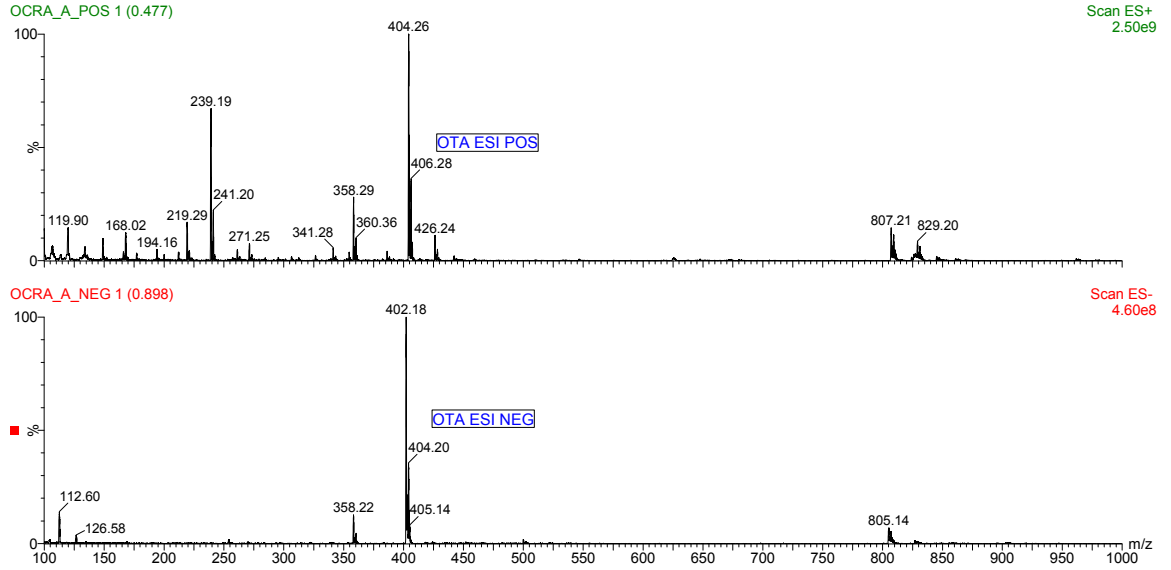
Şekil 3.11. Ortalama idrar OTA düzeylerinin (ng OTA/g kreatinin) bölgeler arası farklılıklarının one-way ANOVA yöntemi ile analizi

* $p < 0.01$, Ankara bölgesine ait idrar OTA düzeyleri Diyarbakır, İstanbul ve İzmir bölgeleri ile kıyaslandığında (One-way ANOVA)

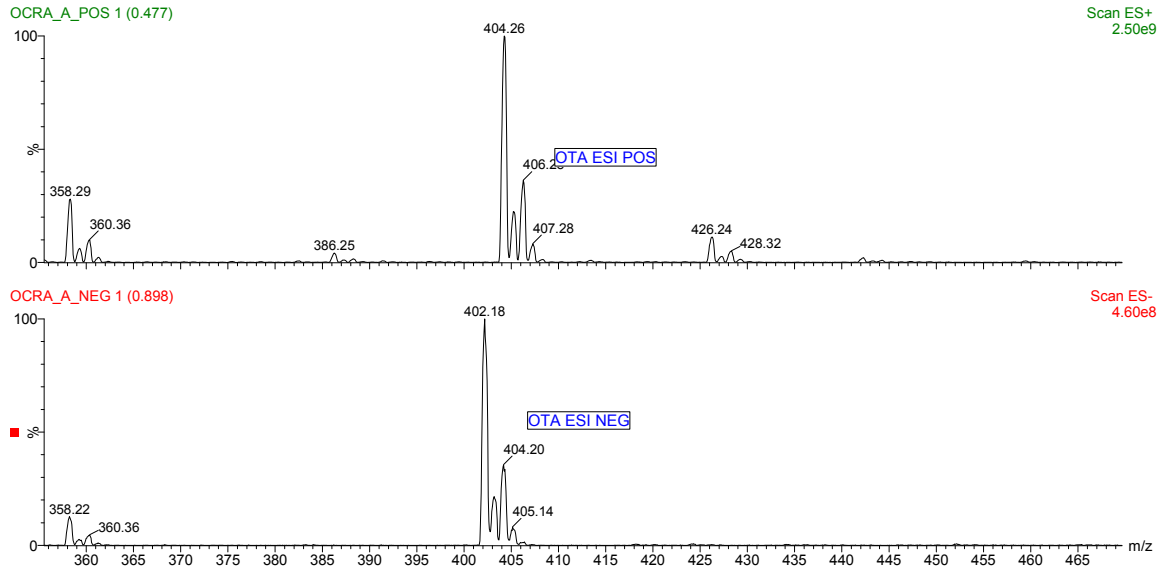
** $p < 0.05$, İzmir ve Diyarbakır bölgelerine ait idrar OTA düzeyleri, İstanbul ile kıyaslandığında (One-way ANOVA)

3.6. LC/MS ile Yapılan Doğrulama Çalışmasına Ait Bulgular

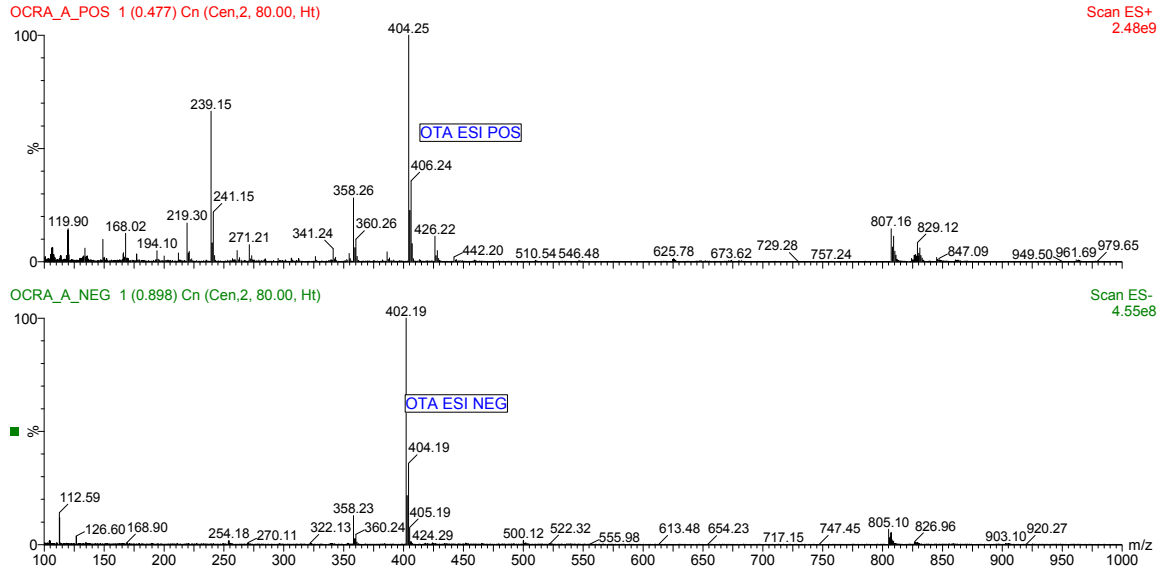
HPLC/MS ile yapılan doğrulama çalışmasında negatif ve pozitif ESI mode enjeksiyonlar yapılmış ve enjeksiyonların pozitif ESI mode olarak yapılmasına karar verilmiştir (Şekil 3.11, 3.12, 3.13 ve 3.14).



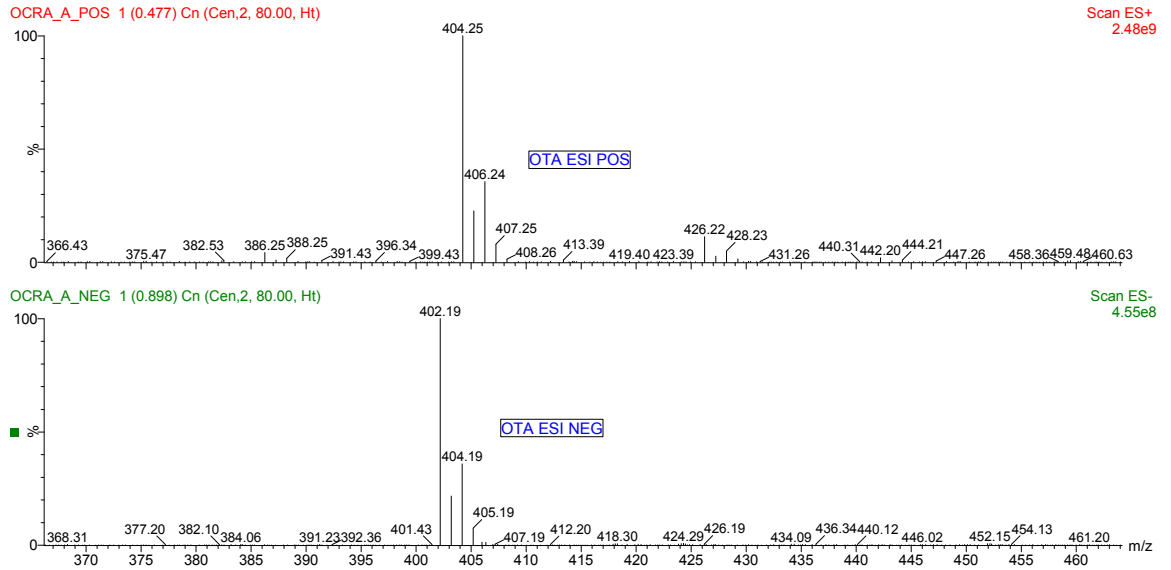
Şekil 3.12 OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Continium Mode



Şekil 3.13. OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Continium Mode zoomlanmış spektrum.



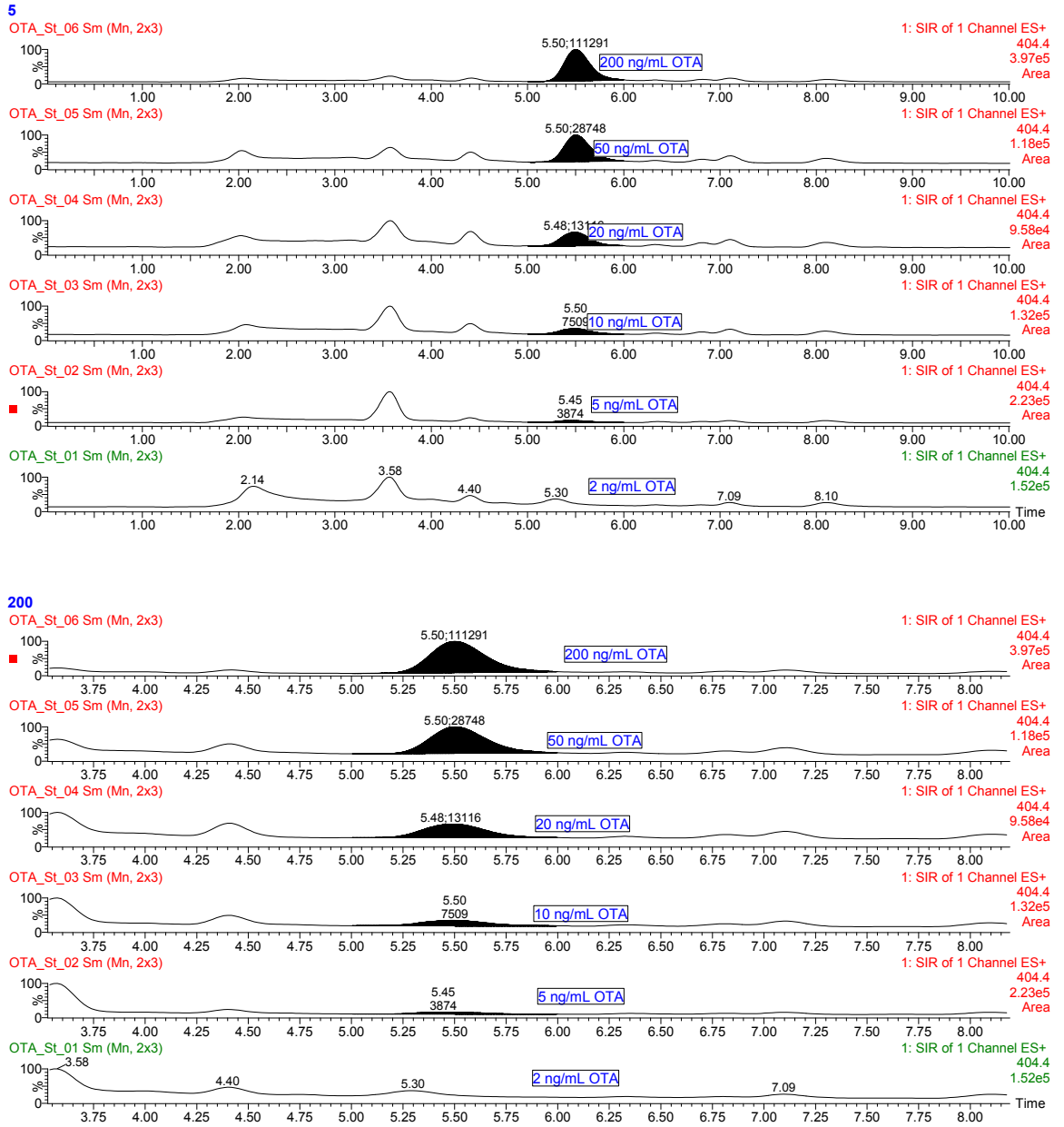
Şekil. 3.14. OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Centroid Mode



Şekil 3.15. OTA MS Scan (100-1000) Direct Infusion Pozitif ve Negatif ESI Centroid Mode

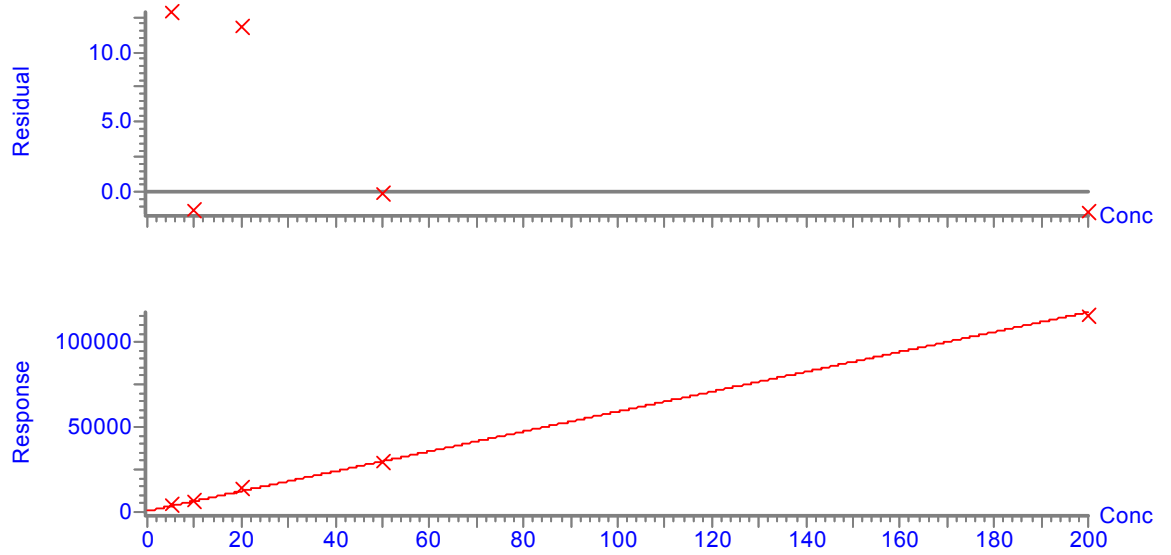
Cihazda OTA için ölçüm aralığını ve miktarını belirlemek amacıyla 2, 5, 10, 20, 50, 200 ng/mL olmak üzere 6 farklı düzeyde hazırlanmış olan OTA standartların pozitif ESI mode enjeksiyonları yapılmış, elde edilen değerlere karşı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Enjeksiyonlar sonucu elde edilen spektrumlar Şekil 3.15'te görülmektedir. En

düşük kalibrasyon standardı olan 2 ng/mL düzeyde spektrum elde edilememiş bu nedenle korelasyon katsayısı hesaplanırken bu düzeydeki standarda ait değer kullanılmamıştır (Şekil 3.16).



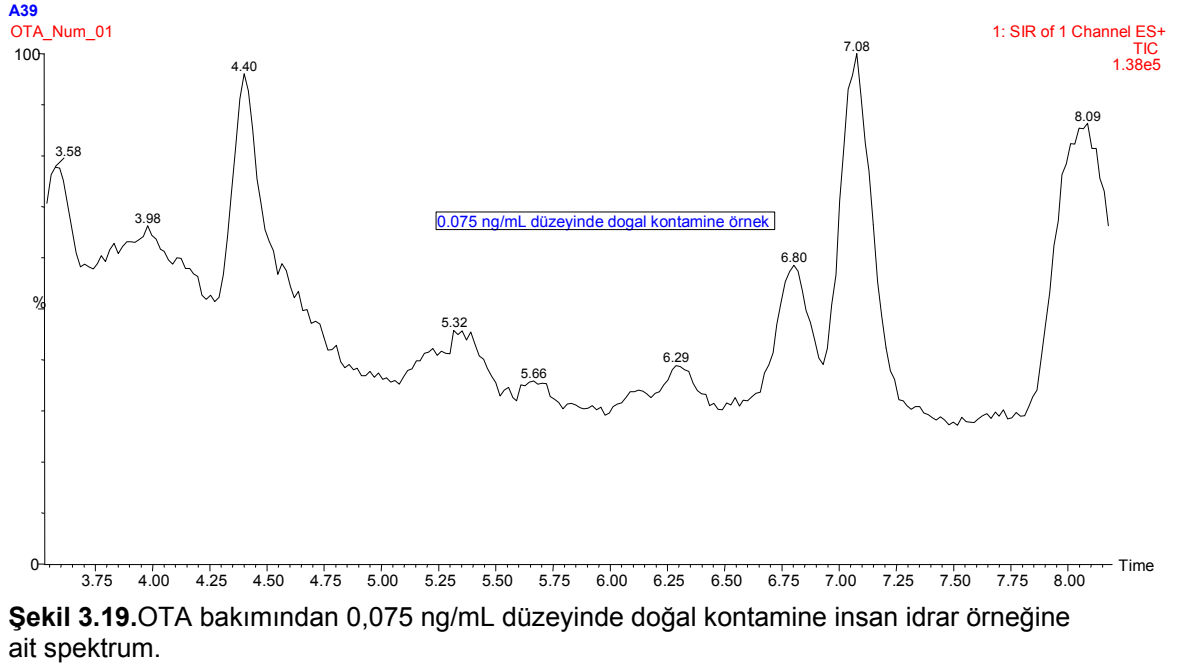
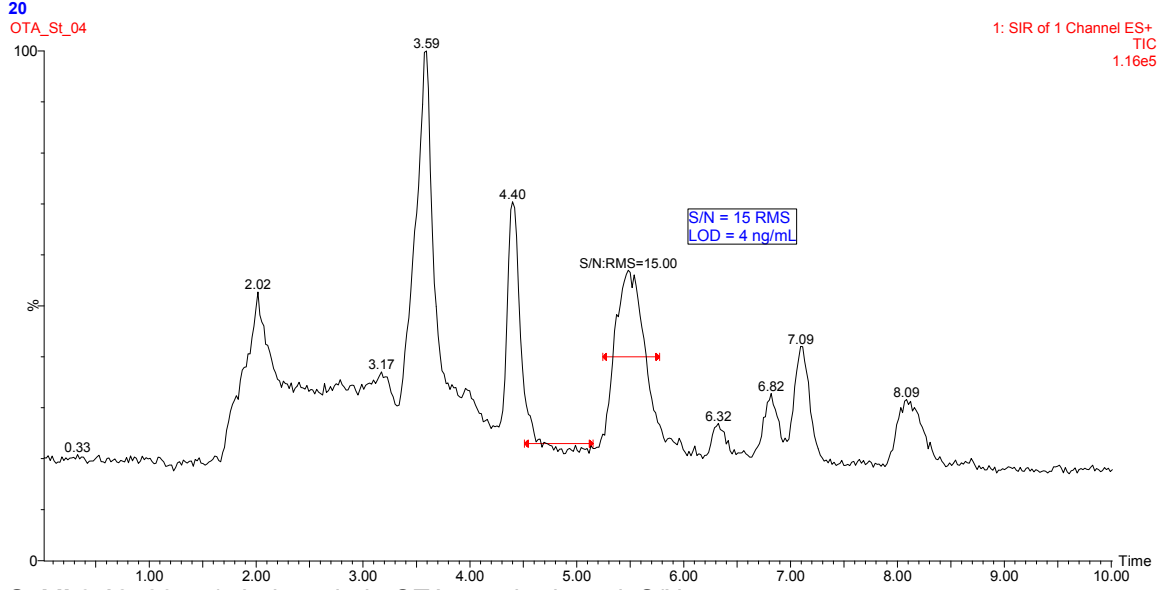
Şekil 3.16. Altı farklı düzeyde hazırlanmış olan OTA standartlarında elde edilen spektrumlar.

Compound name: OTA
 Correlation coefficient: $r = 0.998676$, $r^2 = 0.997354$
 Calibration curve: $584.378 * x + 638.143$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Şekil 3.17. OTA'nın, cihaz tarafından ölçülen alanına karşılık regresyon eğrisi

Yapılan standart enjeksiyonlarında, sinyal/ gürültü (S/N)'den Tespit Limiti (LOD), 4 ng/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.17). Elde edilen LOD değerine bağlı olarak numunelerin HPLC ile yapılmış olan miktarsal tayinlerine bağlı olarak cihazın inebildiği hassasiyet limitlerinin çok üstünde olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmada kullanılmış olan insan idrar örneklerine ait doğal kontamine ürünlerde OTA düzeylerine (0.006–0,0075 ng/mL) inilememiştir (Şekil 3.18).



4. TARTIŞMA

4.1 İdrar Örneklerinde OTA Tayini

Popülasyondaki maruziyeti takip edebilmek açısından idrar örneği toplanması kan örneği toplanmasına göre daha yaygın bir yöntemdir. Aynı zamanda, popülasyondaki maruziyeti izlemek açısından idrarda OTA analizi daha kullanışlı bir yöntem ve iyi bir biyogöstergeci (Pena ve ark. 2006).

A,B ve C olmak üzere 3 tip okratoksin tanımlanmıştır (Shotwell ve ark. 1969). OTA, okratoksinler grubu içerisindeki en önemli ve tek toksikolojik öneme sahip olan mikotoksindir. Toksinin dağılımını inceleyen araştırmalar *A. ochraceus* birincil olarak okratoksin A ürettiğini, OTA ya göre daha az toksik özelliğe sahip olan Okratoksin B ve dihidroizokumarik asidi ise daha az ürettiğini ve OTA'nın etil esteri olan okratoksin C'ye gıda ve hayvan yemlerinde doğal kontaminant olarak ender rastlandığını ortaya koymuştur (Fuchs ve ark. 1984, Trenk ve ark. 1971). Yukarıda verilen nedenlerden dolayı bu araştırmada yalnızca, insanlar için en yüksek toksik etkiye sahip ve en yaygın bulunan okratoksin türü olan OTA'nın tespit ve teşhisi yapılmıştır.

İnsan, fare sıçan ve domuzlarda yapılan çalışmalarda OTA'nın karaciğer mikrozomlarındaki sitokrom P450 ler tarafından 4-OH-okratoksin A'ya okside olduğu görülmüştür. Tüm metabolitlerinin OTA 'nın kendisinden daha az toksik olduğu düşünülmektedir. Sıçanlara verilen radyoaktif olarak işaretlenmiş OTA'nın en önemli metabolit olan okratoksin α 'nın, %33'ü dışkıyla,, % 26'sı ise idrarla atılır. Daha sonra %6 OTA ve %1,5 4R-OH-okratoksin A'dır (Walker ve Larsen 2005). OTA metabolitlerine göre daha toksik olduğu için idrarla atılan diğer metabolitlerinin teşhisine gidilmemiştir.

Literatürde farklı matriks tiplerinde OTA tespiti için pek çok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerde özellikle, IAK clean-up kullanıldığında, en

kritik nokta ekstraksiyon aşamasıdır. Çalışmada daha yoğun olması açısından sabah ilk idrar örnekleri toplanmıştır. İdrar örneklerinin OTA analizleri için temel olarak Fazekas ve ark. (2005) yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan yöntemin, HPLC'ye uygun hassasiyetini kaybetmeden daha kolay hale getirebilmesi amacıyla bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Filtre kağıdından süzme aşaması yerine, santrifüjleme tekniği kullanılmış böylece daha temiz bir ekstrakt elde edilirken işlem hızlandırılmıştır. Ayrıca IAK kolondaki OTA'yı vialde toplayabilmek için Pascale ve ark. (2000) ve Fazekas ve ark. (2005) yönteminden farklı olarak IAK'da toksin kalması riskini önlemek amacıyla elüsyon çözücüsü olarak 2 mL metanol yerine 3 mL metanol kullanılmıştır.

Analiz yöntemi için yapılan validasyon çalışması sonucu doğrusallık (linearity) için korelasyon katsayısı $r=0,9922$, kesinlik için 0,02, 0,05, 0,1, 0,5 ve 1 ppb olmak üzere 5 düzeyinde ekleme yapılan örneklerde yapılan çalışmada RSD(%) sırasıyla 3,83, 7,32, 6,91, 3,29 ve 8,86 olarak aynı ekleme yapılmış örneklere ait gerçeklik (trueness) çalışmasında ise % geri alma oranları sırasıyla 100,1, 110,5, 85,7, 92,5 ve 88,6 olarak bulunmuştur. Yönteme ait tanımlama (LOD) ve ölçüm limitleri (LOQ) ise sırasıyla 0,006 ve 0,018 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre, yöntemin EC 401/2006 direktifinde verilen yöntem performans testi ile ilgili parametrelere uygun olduğu görülmüştür. Analizler sırasında azot altında kurutma işlemi sırasında kullanılan 6 mL'lik vialler silanli olmasına rağmen, nötral çözücülerden kaynaklı tuz oluşumu ile OTA kaybını ve cam vialler tarafından absorpsiyon ya/ya da presipitasyonu önlemek amacıyla Entwisle ve ark. (2000) ve Pena ve ark. (2006) tarafından uygulanmış olan asit solüsyonu (%98 sülfürik asit) ile yıkama, yönteme ilave edilmiştir.

Toplanan insan idrar örneklerinde OTA tespit ve teşhisi için monoklonal antibodiler içeren immünoaffinitekolon temizleme yöntemi kullanılmış olması bunun yanı sıra, analiz yönteminin validasyon çalışmasının seçicilik ve hassasiyet parametrelerine ait çalışmalardan elde edilen sonuçlara

dayanarak OTA'nın doğrulama çalışması gerekmemiştir. Fakat çalışmaya zenginlik katmak ve insan biyolojik sıvılarında oldukça düşük miktarlarda (ng/mL düzeylerinde) bulunan mikotoksinlerin LC/MS ile teşhisi yöntemini denemek amacıyla bir çalışma düzenlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen piklerin OTA olduğunun kalitatif olarak analiz edilebilmesi için Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında mevcut olan LC/MS cihazı kullanılmıştır. İnsan idrarı gibi oldukça düşük düzeylerde OTA bulunan biyolojik sıvılar için geliştirilen kütle spektrometrelili teşhise dayalı analiz yöntemlerinin hemen hepsi tandem spektrometre cihazı olarak bilinen ve daha düşük hassasiyet limitlerine inebilen LC/MS/MS cihazı ile ölçümü kapsamaktadır (Zepnik ve ark. 2003, Lau ve ark. 2000). Bu nedenle Shephard ve ark. (2003) tarafından şaraplarda OTA analizi için geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Analiz yönteminin geliştirilmesi sırasında 25 mL idrar örneğinin analizi için yapılan ölçüm ve raporlama limitlerinin (sırasıyla LOD ve LOQ) belirlenmesi çalışmasından elde edilen sonuçlara göre cihazın inebileceği hassasiyetin yeterli olmayacağı görülmüştür. Ayrıca numuneyi temsil eden miktarı artırma işleminin ise immünoaffinite kolondan geçiş sırasında tıkanmalara yol açarak analiz yönteminin doğruluğunu etkileyebilmesi nedeni ile tercih edilmemiştir. İnsan vücut sıvıları gibi düşük düzeyde OTA içeren numuneler için LC/MS ölçüm içeren yöntemin yeterli hassasiyete sahip olmadığı görülmüştür.

Türkiye'nin 4 şehrinden toplanan toplam 233 idrar örneğinde ölçülen OTA değerleri Çizelge 3.7, 3.8, 3.9 ve 3.10'da verilmiştir. Pozitif örnek oranı, ortalama OTA miktarı ve en yüksek kontaminasyona Ankara'da rastlanmıştır (pozitif örnek oranı:%90,1, ortalama OTA konsantrasyonu:14,34 ng/g kreatinin ve en yüksek OTA değeri: 75,60 ng OTA/g kreatinin). Ankara'dan alınan idrar örneklerinin OTA içerikleri Diyarbakır, İstanbul ve İzmir'den alınan idrar örneklerindeki OTA içeriğinden belirgin şekilde yüksek bulunmuştur (t-test $p<0,003$). Bölgesel farklılıklara rastlanmış olması insan vücut sıvılarında toksine maruziyetin ölçülmesi ile ilgili olarak yapılan diğer çalışmalarda ortaya çıkabilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Tüm

illerden alınan idrar örneklerine ait sonuçlar konsantrasyon aralığı, rölatif insidans bakımından Çizelge 4.1’de gruplandırılmıştır.

Çizelge 4.1. Şehirlere göre idrar örneklerindeki OTA içeriği

Şehir	Pozitif örnek oranı (%)	Konsantrasyon Aralığı (min-max) (ng/g kreatinin)	Pozitif örneklerin ortalaması (ng/g kreatinin)
Ankara	90,1	1,14 – 75,6	14,34
İstanbul	80,4	1,83 – 25,57	6,45
İzmir	76,6	2,23 – 26,92	11,13
Diyarbakır	82,6	2,91 – 31,58	9,87

Ancak ülkemizde insan maruziyeti ile ilgili olarak vücut sıvılarında OTA düzeylerinin belirlenmesi konusunda herhangi bir çalışma bulunmadığından elde edilen verilerin daha önceki verilerle karşılaştırılması mümkün olamamaktadır. Bununla beraber diğer ülkelere ait yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak bir değerlendirme yapıldığında, bu çalışma sonucunda idrar örneklerinde rastlanan OTA düzeylerinin ve rastlanma sıklığının, diğer ülkelerde elde edilen verilerle benzerlik gösterdiği dikkat çekmektedir (Pascale ve ark. 2000, Fazekas ve ark. 2005 ve . Pena ve ark. 2006)

4.2 Türkiye Populasyonunda OTA Alımının Değerlendirilmesi

OTA başlıca hububat ve hububat ürünlerinde bulunur. Avrupa Komisyonu tarafından yapılan maruziyet değerlendirme çalışmalarında bu besin maddelerinin OTA’ya başlıca maruziyet kaynağı olduğu bildirilmiştir. Avrupa ülkelerinde OTA’ya maruziyetin %50 oranında hububat ve hububat ürünleri ile beslenme yolu ile olduğu hesaplanmıştır (SCOOP task 3.2.7, 2002). Ülkemizde hububat ve ürünlerinde OTA düzeylerinin ve varlığının tespit edilmesi amacıyla yapılan sınırlı sayıda çalışmalar, bu gıda maddelerinin OTA içeriklerinin oldukça düşük düzeyde ve yasal limitlerin altında olduğunu göstermiştir. Ancak hububat ve ürünleri dışındaki kahve, kuru üzüm, şarap, bira, başta kırmızıbiber olmak üzere baharatlar ile diğer maruz kalma kaynaklarının OTA düzeyleri ile ilgili detaylı bilgiye ulaşılamadığı için

araştırma sonucu ortaya çıkan yüksek görülme sıklığının hangi gıda ürünlerinden kaynaklandığı konusunda ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda toplanan örneklerin büyük bir kısmında (%83), OTA'ya rastlanmıştır. Bu sonuç insan popülasyonu tarafından tüketilen gıdalarda halihazırda OTA bulunduğunu göstermektedir. Diğer ülkelerde daha önce kan ve idrar örneklerinde yapılmış olan çalışmalar bu görüşü desteklemektedir. Bu çalışmaya ait bulgular ve yapılan diğer çalışmalara ait bulgulara göre insan popülasyonunun OTA alımı genelde düşüktür (<1 ng/kg vücut ağırlığı/gün). Türkiye'de OTA'ya maruziyetin bölgesel farklılık nedeninin, bölgesel beslenme alışkanlığı ile ilgili olabileceği şeklinde yorumlansa da farkın nedeninin daha ileri araştırmalarla ortaya konulması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

İnsanlarda OTA'ya maruziyeti ölçmek amacıyla yapılan çalışmada idrarda OTA'nın kromatografik yöntemler kullanılarak tespit edilmesinin yanı sıra çalışmaya katılan gönüllülere uygulanan anket soruları ile aynı zamanda maruziyetin profili de ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu nedenle cinsiyet, yaş, sigara ve alkol kullanımı, kahve tüketimi ve beslenme alışkanlıklarına ait sorulara verilen cevaplarla maruziyetin nedeni ve etkileyen faktörler de değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ancak beslenme alışkanlıkları ve tüketim dataları açısından kısıtlı olan anket soruları toksine maruziyetle söz konusu parametreler arasında belirgin bir korelasyon oluşması açısından yeterli olmamış bununla birlikte bölgesel farklılıkların yüksek olması bazı bölgelerde kapsamlı çalışmalar yapılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur. Bunlara ek olarak ülkemizde, insan maruziyetinin ölçülmesinin, geniş kapsamlı popülasyona dayanan gıda tüketim araştırmaları ile desteklenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Gıdalarda bulaşanlara ait araştırmaların yanı sıra risk değerlendirme açısından bu tür maruziyet çalışmalarının da etkin bir şekilde sürdürülmesi risk analiz çalışmalarında, uygulamaya yönelik olarak daha doğru tahminler ve objektif sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nem, sıcaklık gibi ortam koşullarına bağlı olarak, pek çok gıda maddesinin kurutulması, saklanması ve depolanması sırasında gelişebilen küflerin ürettiği bir mikotoksin türü olan OTA' ya insanlarda maruziyetin en önemli nedeni bu gıdaların tüketilmesidir. Bu çalışmada, başta böbrek bozuklukları olmak üzere çeşitli toksik etkilere sahip olan OTA için insan maruziyet profili çıkarılması hedeflenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma;

- 1). OTA analizi için seçilen analiz yönteminin çalışılan validasyon parametrelerine göre geçerli ve güvenilir olduğunu,
- 2) Hedeflenen illerde, bölgeye bağlı olmak üzere OTA' ya maruziyetin varlığının ve düzeylerinin, diğer ülkelerde yapılmış olan benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdiğini,
- 3) Gıda güvenliği alanında yapılan çalışmalarda, bulaşanlar için riskin boyutlarının ortaya konulabilmesi ve maruziyet profilinin oluşturulabilmesi için insan vücut sıvılarında söz konusu bulaşanın araştırılmasının önemini,
- 4) Toplanan idrar örneklerinde OTA varlığının ve düzeylerinin, çalışma sırasında yöneltilen anket sorularına verilen cevaplarda yer alan ve hayat tarzı, antropometrik özellikler, sosyoekonomik durum gibi bazı parametrelerle doğrudan korelasyon göstermediğini,
- 5) Yapılacak ileri araştırmalarla OTA' ya maruziyette bölgesel farklılıkların nedenlerinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Günümüzdeki mevcut toksikolojik kanıtların temeline dayanarak, gıdalardaki OTA düzeylerinin, ekonomik ve sosyal faktörler hesaba katılarak, teknolojik imkanlar ölçüsünde en düşük düzeyde olması gerekmektedir. “Korumak, iyileştirmekten daha iyi bir yöntemdir” mantığından yola çıkılarak, tüketicileri OTA'nın toksik etkilerinden korumak için nihai yol iyi tarım uygulamalarını desteklemek ve temin etmektir. İnsanların OTA'ya maruziyetini imkanlar ölçüsünde indirmek ve toksik etkilerinden korumak amacıyla aşağıda belirtilen bazı öneriler getirilmiştir.

- 1) Tarımsal üretim sırasında küflerin geliştiği ve OTA ürettiği kritik noktaların açıklanması gerekmektedir.
- 2) OTA üreten küflerin gelişimini önlemek amacıyla kurutulmuş besinlerin soğuk ve kuru ortam koşullarında saklanması gıdalarda toksin oluşumu riskini azaltabilir.
- 3) Tarımsal üretimde kalite kontrol programı uygulanması gereklidir.
- 4) Tüm üretim aşamalarında çalışan kişilerin eğitilmesi önem arz etmektedir.
- 5) Tarlada ve depolama sırasında fungal kontaminasyonun önlenmesi için yöntem ve teknikler üzerine yapılan araştırmaların desteklenmesi gerekmektedir.

ÖZET

“Türkiye’nin Çeşitli Bölgelerinden Toplanan İnsan İdrar Örneklerinde Okratoksin A (OTA) Varlığının ve Düzeylerinin İmmünoaffinite Kolon–Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Araştırılması”

Okratoksin A, nem ve sıcaklık gibi etkenlere bağlı olarak çeşitli gıdalarda gelişebilen *Aspergillus* ve *Penicillium* türü küfler tarafından üretilen bir mikotoksindir. Çeşitli araştırmalar OTA’nın, karsinojenik, genotoksik, teratojenik, immünotoksik ve nefrotoksik olduğunu ortaya koymaktadır. Aynı zamanda çoğunlukla güneydoğu Avrupa ülkelerinde görülen Balkan Endemik Nefropati (BEN)’nin nedeni olarak gösterilmektedir. OTA, Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi (IARC) tarafından yapılan sınıflandırmada grup 2B’de yer almaktadır.

Bu çalışmada insan idrarında OTA varlığının ve düzeyinin belirlenebilmesi için NaHCO₃ dilüsyonu, İAK yöntemi, floresan dedektörlü HPLC ile teşhis ve tayin yöntemi kullanılmıştır. Analiz yöntemi için yapılan tekrarlanabilirlik, doğruluk, seçicilik, hassasiyet, teşhis ve tayin limitleri gibi parametreleri içeren validasyon çalışması sonucu doğrusallık (linearity) için korelasyon katsayısı $r=0.9922$, kesinlik için, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 ppb olmak üzere 5 farklı düzeyde standart katılan örneklerde yapılan çalışmalarda, RSD (%) sırasıyla 3.83, 7.32, 6.91, 3.29 ve 8.86 olarak, aynı örnekler için gerçeklik çalışmasında ise % geri alma oranları sırasıyla 100.1, 110.5, 85.7, 92.5 ve 88.6 olarak bulunmuştur. Yönteme ait tanımlama (LOD) ve ölçüm limitleri (LOQ) ise sırasıyla 0.006 ve 0.018 ng/mL olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre yöntemin, EC 401/2006 direktifinde verilen yöntem performans testi ile ilgili parametrelere uygun olduğu görülmüştür.

Analizler için çalışmaya katılan gönüllülerden sabah ilk idrar örneği alınmış kreatinin tayini ile düzeltme yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Ankara, İstanbul, Diyarbakır ve İzmir olmak üzere Türkiye’nin 4 şehrinde toplanan toplam 233 idrar örneğinin büyük bir kısmında (%83) OTA bulunmuştur. Ölçülen OTA değerleri içerisinde pozitif örnek oranı, ortalama OTA miktarı ve en yüksek kontaminasyon Ankara’da saptanmıştır (pozitif örnek oranı:%90.1, ortalama OTA konsantrasyonu:14.34 ng/g kreatinin ve en yüksek OTA değeri: 75.60 ng/g kreatinin). Ankara’dan alınan idrar örneklerinin OTA içerikleri Diyarbakır, İstanbul ve İzmir’den alınan idrar örneklerindeki OTA içeriğinden belirgin şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.003$).

İnsanlarda OTA’ya maruziyeti ölçmek amacıyla çalışmaya katılan gönüllülere uygulanan anket soruları ile aynı zamanda maruziyetin profili de ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Ancak cinsiyet, yaş, sigara ve alkol kullanımı, kahve tüketimi ve beslenme alışkanlıklarına ait sorulardan elde edilen cevaplara bağlı olarak OTA maruziyeti ile anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

Anahtar kelimeler: HPLC yöntemi, İdrar, Yöntem Validasyonu, Mikotoksinler, Okratoksin A

SUMMARY

Investigation on Occurrence and Levels of Ochratoxin A (OTA) in Human Urine Samples Collected from Different Regions of Turkey by Immunoaffinity Column Clean-up and High-Performance Liquid Chromatography

Ochratoxin A (OTA), a mycotoxin produced by several fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* species in the food chain, has nephrotoxic, hepatotoxic, carcinogenic, teratogenic and immunotoxic effects. It is also claimed that ochratoxin A mostly causes Balkan Endemic Nephropathy (BEN) seen in Southeastern European countries. OTA is classified as a possible carcinogen to human (Group 2B) by the International Association of Research on Cancer (IARC).

In this study in order to define the OTA occurrence and level in human urine, NaHCO₃ dilution, IAC clean-up and HPLC fluorescent detection and definition methods were used. As a result of the validation study for the analysis method that includes the parameters like repeatability, trueness, selectivity, accuracy for the limit of quantification and limit of detection for linearity the correlation factor is $r=0.9922$, for precision, worked on 5 level spiked samples as 0.02, 0.05, 0.1 and 1 ppb, the RSD (%) was found as 3.83, 7.32, 6.91, 3.29 and 8.86 respectively. On the same spiked samples for the trueness study, the recovery percentage rates were found as 100.1, 110.5, 85.7, 92.5 and 88.6 respectively. (LOD and LOQ) of the method were measured as 0.006 and 0.018 ng/mL respectively. According to these results the parameters related to the performance test for EC regulation of 401/2006 were found suitable.

For the analysis, first morning urine samples were collected from the voluntaries and the results were adjusted with creatinine levels. The urine samples were collected from 4 different cities as Ankara, İstanbul, Diyarbakır and İzmir. From the total collected samples of 233 larger amounts of 83% was contaminated with OTA. Among the measured OTA levels, positive sample rate, average OTA amount and the highest contamination was found in Ankara. (Positive sample rate; 90.1%, average OTA concentration; 14.34 ng/g creatinine and highest OTA value; 75.60 ng/g creatinine). The OTA contents of the urine samples collected from Ankara were higher than the OTA contents of the urine samples of Diyarbakır, İstanbul and İzmir ($p<0.003$).

In order to define the exposure profile to OTA in human a questionnaire was conducted among the voluntaries as well. But after the evaluation of the answers related to the gender, age, dietary habits, coffee consumption, smoking and alcohol habits, no correlation was found with the OTA exposure.

Key words: HPLC Method, Urine, Method Validation, Mycotoxins, Ochratoxin A

KAYNAKLAR

ANON, 1995, Official Methods of Analysis, Ochratoxins in Barley, C-IAC with fluorometric determination, Method 973.37, *AOAC International* 16 (49).

ANON, 1996 Gıdalarda Katkı, Kalıntı ve Bileşenlerin İzlenmesi, T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Koordinatör kuruluş: Bursa Gıda Teknolojisi Araştırma Enstitüsü, Bursa, 107-130.

ATROSHİ F., BİESE I., SALONİEMİ H., ALİ-VEHMAS T., SAARİ ALDO RİZZO S., VEİJALAİNEN P., 2000, Significance Of Apoptosis And Its Relationship To Antioxidants After Ochratoxin A Administration In Mice, *J. Pharm Pharmaceut Sci.* **3**(3): 281-291

BAUDRİMONT I., AHOUANDJİVO R., CREPPY E.E 1997 Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents *Chem.Biol.Interact.*, **104**; 29-40

BAYMAN P., BAKER J. L, DOSTER M. A., MİCHAİLİDES T. J., MAHONEY N. E., 2001, Ochratoxin Production by the *Aspergillus ochraceus* Group and *Aspergillus alliaceus*, *Appl Environ Microbiol*, **68**(5);2326–2329

BELMADANİ A., TRAMU G., BETBEDER A M., CREPPY E E., 1998 Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartame, a sweetener, *Hum Exp Toxicol.*, **17**(7): 380-386

BETINA, V., 1989. Mycotoxins, Chemical Biological an Environmental Aspects. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, Tokyo, 437 p.

BREİTHOLTZ-EMANUELSSON A., PALMİNGER-HALLEN I., WOHLİN P.O., OSKARSSON A., HULT K., OLSEN M., 1993 Transfer of ochratoxin A from lactating rats to their offspring: a short term study, *Nat. Toxins* **1**:347.

CAVİN C., DELATOUR T., MARİN-KUAN M., HOLZHÄUSER D., HİGGİNS L., BEZENÇON C., GUİGNARD G., JUNOD S., PİGUET D., RİCHOZ-PAYOT J., GREMAUX E., HAYES J. D., NESTLER S., MANTLE P., SCHİLTER B.,2006 Reduction in antioxidant defences may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity, *ToxSci Advance Access published November 16, 2006*

CHANDRASEKHARAN N.V., DAİ H., ROOS K.L., EVANSON N.K., TOMSİK J., ELTON T.S., SİMMONS D.L., 2002 COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression, *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* **99**:13926-13931

JONG-CHOON K., MOON-KOO C., MOO-HYUNG J. AND SANG-SEOP H., 1994, Embryotoxic Effects of Ochratoxin A and Amelioration By Phenylalanine in Rats, Korean Medical Database, 10 (2):193-206, Erişim tarihi:18 Mayıs 2008
Erişim:<http://kmbase.medic.or.kr/Main.aspx?d=KMBASE&m=VIEW&i=0379519940100020193>

CODEX ALİMENTARIUS COMMISSION,1998 Position Paper on Ochratoxin A. CCFAC Agenda item 14(a) CX/FAC 99/14. November 1998 Erişim tarihi 04.05.2008
Erişim:[http://www.fehd.gov.hk/safefood/report/och_a2/images/cfs_news_ras_23_och.pdf]

DAVIS N. D., SEARCY J. W., DIENER U. L., 1969, Production of Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic Medium, *Appl Microbiol.*, **17**(5):742-744

DE GROENE E.M., HASSING I.G.A.M., BLOM M.J., SEINEN W., FINK-GREMMELS J., HORBACH G.J., 1996, Development of human cytochrome P450-expressing cell lines application in mutagenicity testing of ochratoxin A, *Cancer Res.*, **56**:299-304

DEMİR T., ÖZAR, A. I., GÜLSEVİM, O., ÇOKSÖYLER, N., AKSOY, U., DÜZBASTILAR, M., 1990 Ege Bölgesinde Incirlerde Görülen Aflatoksin, Okratoksin-A Olusumu ile Önlenmesi Üzerinde Araştırma, Proje Nihai Raporu, KKGA/B/03/F/052, (yayınlanmamış),

DOORTEN S.A.Y., BULL S., VAN DER DOELEN M.A.M., FINK-GREMMELS J., 2004 Metabolism mediated cytotoxicity of ochratoxin A, *Toxicol. In vitro* **18**:pp. 271-277.

EC, 2006 Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs, COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006, *Official Journal of the European Union*, **70**:112-134

EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain, 2006, Opinion of the on scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food, *The EFSA Journal*, **365**, 1-56.

EL ADLOUNI C., PINELLI E., AZEMAR B., ZAOUI D., BEAUNE P., LESZKOWICZ A.P., 2000 Phenobarbital increases of DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase, *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**:123-131

ELLING F., NIELSEN JP., LILLEHØJ EB., THOMASSEN M.S., STØRMER F.C., 1985, Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicol.*, **23**(2):247-254

ENTWISLE, A.C., WILLIAMS, A.C., MANN, P.J., SLACK, P.T., GILBERT, J., 2000. Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study. *Journal of AOAC Int.*, **83**:1377-1383

FAO Agriculture and Consumer Protection 2003, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, Erişim Tarihi: 21 Nisan 2008
Erişim: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e0k.htm#TopOfPage>

FUCHS R., HULT K., PERAICA M., RADIC B., PLESTINA R., 1984. Conversion of ochratoxin C in to ochratoxin A in vivo, *Appl Environ Microbiol.*, **48**:41-42

FUKUI Y., HAYASAKA S., TAKEUCHI Y., 1991, A quantitative assessment of the development of neurons and synapses in the cerebral cortex of ochratoxin A-induced microcephalic mice, *Teratology*, **44**(6):35B

- FAZEKAS B., TAR A., KOVACS M. 2005 Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(1): 35-44 *Free Radic. Biol. Med.*, **30**:1089–1098
- GALTIER, P., M ALVĪNERĪE, 1976. In vivo transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Ann. Rech. Vet.* 7:91-98
- GAUTIER J.C., HOLZHAUSER D., MARKOVIĆ J., GREMAUD E., SCHILTER B., TURESKY R.J., 2001 Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats, *Free Radic. Biol. Med.* **30**:1089–1098
- GEKLE M, SILBERNAGL S., 1996, Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach. *Kidney Blood Press Res.* **19**(5):225-235
- GILBERT J., BRERETON P., MACDONALD S. 2001 Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Addit. Contam.*, **18**:2, 1088-1093.
- GROSS-STEINMEYER K., WEYMANN J., HEGE H.G., METZLER M., 2002 Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured and human primary hepatocytes, *J. Agric. Food Chem.*, **50**:935–938.
- HAUBECK H-D., LORKOWSKI G., KÖLSCH E., RÖSCHENTHALER R., 1981, Immunosuppression by Ochratoxin A and Its Prevention by Phenylalanine, *Appl Environ Microbiol.*, **41**(4): 1040-1042
- HULT K., PLESTINA R, HABIZAN-NOVAK V., RADIC B. and CEOVIC S., 1982, Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy *Archives of Toxicology*, **51**:313-321
- HUNDHAUSEN C., SAADATMANDI C. B., AUGUSTIN K., BLANK R., WOLFFRAM S., RIMBACH G., 2005 Effect of vitamin E and polyphenols on ochratoxin A-induced cytotoxicity in liver(HepG2) cells. *J. Plant Physiol.*, **162**(7):818-822
- HESELTYNE W.C., VANDEGRAFT E. E., FENNEL I., SMITH M. L., SHOTWELL O. L., 1972, Aspergilli as ochratoxin Producers, *Mycologia*, **64**(3):539-550.
- HOPMANS E. C., 1997, Patulin: a Mycotoxin in Apples, *Perishables Handling Quarterly Issue No.* **91**: 5.
- IARC. 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, p 571.
- JECFA 2001 Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food, WHO Food Additives Series. Prepared by the Fifty-sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives **47**:281-381.
- JUMP D.B., 2002, The biochemistry of n – 3 polyunsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **277**:8755-8758.

KARAGÖZLÜ N. VE KARAPINAR M., 1998 Bazı Tahıl ve Ürünlerinde Okratoksin A ve Fungal Konatminasyon. *Türk J. Biol.*, **24**:561-572.

KISSLING K-H., PETERSON H., SANDHOLM K., AND OLSEN M., 1984. Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone and Three Trichotecenes by Intact Rumen Fluid, Rumen Protozoa and Rumen Bacteria *Appl Environ Microbiol.*, **47**(5):1070-1073.

KUIPER-GOODMAN T., GRANT G.L., 2008, Ochratoxin A, Toxicological Evaluation Division, IPCS-INCHEM Erişim Tarihi:08.05.2008
Erişim:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je19.htm>

KÜHN I., VALENTA H., ROHR K., 1995, Determination of ochratoxin A in bile of swine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, **668**:333-337.

KYPRIANOU M., 2005 Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005, amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A

LAU B. P.-Y., M. SCOTT, P. LEWIS D. A. and KANHERE S. R., 2000, Quantitative determination of ochratoxin A by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **35**:23-32

MALLY A., ZEPNÍK H., WANEK P., EDER E., DINGLEY K., IHMELS H., VÖLKEL W., DEKANT W., 2004, Ochratoxin A: Lack of Formation of Covalent DNA Adducts, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**:234-242

MALLY A., HEUSLER H. K., AMBERG A., KURZ M., ZEPNÍK H., MANTLE P., VÖLKEL W., HARD G. C., DEKANT W. 2005 Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **206**(1); 43-53

MARQUARDT R. R., FROHLICH A. A., 1992 A review of recent advances in understanding ochratoxicosis, *J Anim Sci.*, **70**:3968-3988.

MERWE K.J., STEYN P.S., FOUÏRE L. 1965, The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh, *J. Chem. Soc.*, 7083-7088

MICCO C., MIRAGLIA M., BRERA C., CORNELI S., AMBRUZI A., 1995, Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy, *Food Addit. Contam.*, **12**:351-354

MOSS, M. O., 1996, Mode of formation of Ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **13**:5-9.

NIESH 1991, Report On Carcinogens ochratoxin A, CAS No. 303-47-9, Eleventh Edition, First Listed in the Sixth Annual Report on Carcinogens Erişim tarihi : 08.05.2008 Erişim:<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s140ochr.pdf>

NIEMIEC J., BORZEMSKA W., ROSZKOWSKI J., KARPINSKA E., 1990, Influence of ochratoxin A contaminated feed on chick embryogenesis Archiv fur Geflugelkunde, **54**(2):70-3 Erişim tarihi 04.05.2008
Erişim <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/temp/~du8Jxf:1>

OBRECHT-PFLUMIO S., DIRHEIMER G., 1999 In vitro DNA and nucleotides adducts formation caused by ochratoxin *Chemico-Biological Interactions* **27**(1):29-44.

OMAR R., GELBOİN H.V., RAHİMTULA A.D., 1996 Effect of cytochrome P450 Induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A, *Biochem. Pharmacol.*, **51**:207-216.

ÖZÇELİK N., KOŞAR A., SOYSAL D. 2001 Ochratoxin A in human serum collected in Isparta-Turkey from healthy individuals suffering from urinary disorders. *Toxicol. Lett.*, **121**:19-13.

ÖZKAYA, Ş., ELDEN, E., BAŞARAN, A., KAYMAK, T., ÇOKSÖYLER, N., KESİCİ, S., BALIKÇI, T., TOPUZ, F., ÖZKAN, R., ALMA, A. 2003. Kırmızıbiberde Aflatoksin Oluşumu Nedenleri ve Çözüm Yolları Üzerinde Araştırmalar (poster bildiri özeti). Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül 2003, İstanbul. sa 181.

ÖZKAYA, Ş., 2005. Mikotoksinler – İnsanlar Üzerindeki Etkileri ve Yasal Düzenlemeler. 4. Gıda Mühendisliği Kongresi. 29 Eylül – 1 Ekim 2005, Ankara.

PALMİNGER HALLEN I., BREİTHOLTZ-EMANUELSSON A., HULT K., OLSEN M., OKARSSON A., 1998 Placental and lactational transfer of ochratoxin A in rats, *Nat. Toxins.*, **6**:43.

PASCALE M., VISCONTI A., 2000 Rapid method for determination of ochratoxin A in urine by immunaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Mycopathologica*, **152**: 91- 95.

PENA A. SEÍFRTOVA M. LİNO C. SİLVEİRA I., SOLİCH P., 2006 Estimation of ochratoxin A in portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Food Chem Toxicol.*, **44**; 1449–1454.

PETRIK J, GRUBIŠIĆ T. Z., BARIŠIĆ K., PEPELJNJAK S., RADIĆ B., FERENCIĆ Z., CEPELAK I., 2003 Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney, *Arch Toxicol.*, **77**: 685–69.

PETZİNGER E., ZİEGLER K., 2000, Ochratoxin, A from a toxicological perspective, *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **23**:91-98.

PFOHL-LESZKOWICZ A., PİNELLİ E., BARTSCH H., MOHR U., CASTEGNARO M., 1998 Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A induced genotoxicity and carcinogenicity of ochratoxin A in rats, *Mol. Carcinog.*, **23**:6-85.

PİNELLİ E., EL ADLOUNİ C., PİPY B., QUARTULLİ F., PFOHL-LESZKOWICZ A., 1999 Roles of cyclooxygenase and lipoygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **7**:95-107.

PİSANİ, P., FAGGİANO, F., KROGH, V., PATH, D., VİNCİS., AND BERRİNO F. Relative, 1997 Validiy and reproducibility of a food-frequency dietary questionnaire for use in the Italian EPIC centers. *Int. Epidemiol.*, **26**:52-160.

PİTT, J.I., 1979. The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. London – New York – Toronto – Sydney – San Fransisco. ISBN 0-12-557750-7. 634 p.

POHLAND, A.E., WOOD, G.E., 1987. Occurrence of Mycotoxin in Food: Mycotoxins in Food. P.Krogh (Ed.). Academic Press Inc., London, 35-64.

POHLAND A. E., NESHEIM S., FRIEDMAN L., 1992, Ochratoxin A: A Review, *Pure & Appl. Chem.*, **64**(7), 1029-1046.

RADIC B., FUCHS R., PERAICA M. and LUCIC A., 1997, Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia, *Toxicol Lett.*, 91(2): 105-109

REGULATION (EC) NO 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs,

RESMÎ GAZETE: 17 Mayıs 2008 tarihli ve 26879 sayılı. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ(Tebliğ No:2008/26).

RİNGOT D., CHANGO A., SCHNEIDER Y-J., LARONDELLE Y., 2006, Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update *Chemico-Biological Interactions* Volume **159**(1):18-46

RİSK ASSESSMENT STUDİES REPORT No:23 2006Ochratoxin A in Food Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department The Government of the Hong Kong Special Administrative Region Erişim tarihi 04.05.2008
Erişim:http://www.fehd.gov.hk/safefood/report/och_a2/images/cfs_news_ras_23_och.pdf

RİBELİN W.E., FUKUSHİMA K., STİLL P.E., 1978 The toxicity of ochratoxin A to ruminants, *Can. J. Comp. Med.* **42**:172-176.

ROTH A., CHAKOR K., CREPPY E.E., KANE A., RÖSCHENTHALER R., DİRHEİMER G., 1988, Evidence of an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice, *Toxicology* **48**:293-308.

SAMSON, A.S., HOEKSTRA E.S., OORSCHOT C.A.N. VAN, 1984. Introduction to Food Borne Fungi. Centraalbureau Voor Schimmelmcultures. Second edition. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. 248 p.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF) 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. 26 February 2002 Erişim Tarihi 28 Kasım 2007
Erişim:http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF) 1998. Opinion on ochratoxin A. Expressed on 17 September 1998, the Scientific Committee on Food, the European Commission. Erişim Tarihi 23 Aralık 2008
Erişim: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out14_en.html]

SCOOP Task 3.2.7, 2002, European Commission. Reports on tasks for scientific cooperation. Reports of experts participating in Task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States, , January, 2002
Erişim Tarihi 04.05.2008, Erişim:[http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf]

SCHIERL R., 2000 Environmental monitoring of platinum in air and urine, *Microchemical Journal* **67**:245–248.

ŞEVİKTÜRK İ. M., GÖNÜLALAN Z., 2007, Kayseri’de Tüketime Sunulan Bazı Tahıl Ürünlerinde Ochratoxin A Miktarları Sağlık Bilimleri Dergisi(Journal of Health Sciences) **16**(2):86-90.

SHEPHARD G. S., FABIANI A., STOCKKENSTRÖM S., MSHICILELI N. and SEWRAM V., 2003, Quantitation of Ochratoxin A in South African Wine, *Agric. Food Chem.* **51**:1102–1106

SHOTWELL O. L., HESSELTINE C. W. and GOULDEN M. L., Ochratoxin A: Occurrence as Natural Contaminant of a Corn Sample *Appl. Microbiol.*, **17**(5): 765-766

SKAUG M. A., STØRMER F. C., SAUGSTAD O.D., 1998 Ochratoxin A: a naturally occurring mycotoxin found in human milk samples from Norway, *Acta Paediatr.***87**(12):1275-1278.

SKAUG M.A., HELLAND I., SOLVOLL K., SAUGSTAD O.D.,2001 Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake, *Food Addit. Contam.* **18**:321–327.

SONALS.,ORUÇ H. H. 2000 Bursa Bölgesindeki Tavuk Çiftliklerinden Sağlanan Yemlerde Mikotoksin Düzeyleri, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.***11**(2):1–6.

SOYÖZ M., ÖZÇELİK N., 2002, Okartoksin A'nın Toksik Etkileri ve Eliminasyonu T. Klin. Tıp Bilimleri **22**:421–427.

STROMER F. C., KOLSAKER P., HOLM H., ROGSTAD S., ELLING F.,1985. Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats. *Appl Environ Microbiol.*, **49**: 1108-1112.

TAGEM,2008, Gıda ve Yem Grubu Proje Değerlendirme Toplantısı Raporları, 25–29 Şubat 2008 Belek Antalya

TASSOU C. C., NATSKOULIS P. I., PANAGOUE E. Z., SPIROPOULOS A. E., MAGAN N., 2007, Impact of water activity and temperature on growth and ochratoxin A production of two *Aspergillus carbonarius* isolates from wine grapes in Greece. *J Food Prot.*, **70**(12):2884-2888

TRENK H.L., BUTZ E. M. And CHU S.F., 1971, Production of Ochratoxins in Different Cereal Products by *Aspergillus ochraceus*, *Appl Microbiol.*, **21**:1032-1035

ÜNLÜTÜRK, A., M. KARAPINAR, F. TURANTAŞ, 1998. Gıdalarda Önemli Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi. Editörler: Adnan Ünlütaş ve Fulya Turantaş. Mengi Tan Basımevi, İzmir. Birinci baskı. ISBN 975–483–383–4. s.28 (toplam sayfa: 605).

VALENTA H. 1998, Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids, *J Chrom A*, **815**(1); 75–92.

- VAR I., KABAK B., 2007, Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines, *Microchem J.*, 41-247.
- VARGA J., KEVEI E., TREN J., KOZAKIEWICZ Z., 1996, Ochratoxin Production by *Aspergillus* species. *Appl Environ Microbiol.*, **62**:4461-4464.
- VAN EGMOND, H.P., 1994, Aflatoxin in milk. The toxicology of Aflatoxins: Human Health, *Vet. Agric. Sig. Acad. Press. Inc.* 365–381.
- WALKER R., LARSEN J.C., 2005, Ochratoxin A: Previous risk assessment and issues arising. *Food Addit. Contam* **1**:6–9.
- WEI X, SULIK K. K., 2005, Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice, *Am. J Med. Genet.*, **47**(6):862 -871
- ZEPNIK H., PAHLER A., SCHAUER U., DEKANT W., 2001, Ochratoxin A-Induced Tumor Formation: Is There a Role of Reactive Ochratoxin A Metabolites? *J. Toxicol. Sci.*, **59**:59–67.
- ZEPNIK H., WÖLKEL W., DEKANT W., 2003, Toxicokinetics of the mycotoxin A in F 344 rats after oral administration, *Toxicol Appl Pharmacol.*, **192**:36-44.

EK-1

ANKET FORMU

Her bir katılımcıya ait kişisel özellikler (hayat tarzı ve beslenme alışkanlıkları) Antropometrik ölçümler(boy, kilo) ve kan basıncı gibi bilgiler elde edinilmesi için anket formu hazırlanmıştır (Pisani 1997, GEMS/FOOD manual 2003).

Soru 1: Örneğin alındığı tarih...(gün/ay/yıl)...../...../20...

Soru 2: Katılımcının yaşı...

Soru 3: Cinsiyeti...

Soru 4: Vücut ağırlığı...

Soru 5: Boyu...

Soru 6: Ortalama aylık geliri

500 YTL'den az 500 YTL ile 1500 YTL arası 1500 YTL' den fazla

Soru 7: Son bir ay içerisinde öğünlerinizde ağırlıklı olarak (daha fazla miktarda) hangi besinleri tükettiniz? (birden fazla cevap yazılabilir)

Tahıl Taze Sebze ve Meyve Kurutulmuş Sebze ve Meyveler

Hayvansal Ürünler Su ürünleri ve/veya Deniz ürünleri Dondurulmuş gıda

Soru 8: Son bir ay içerisinde başta kırmızıbiber olmak üzere ortalama baharat tüketiminiz için aşağıdakilerden hangisini söyleyebilirsiniz?

Hiç tüketmedim Az tükettim Çok tükettim

Soru 9: Son zamanlarda belli bir diyet uygulamasının olup olmadığı.

EVET HAYIR

Yanıt EVET ise nasıl bir diyet uyguladığı ve hangi besinlere daha fazla ağırlık verdiği;

.....

.....

.....

Soru 10: Son bir ay içerisindeki günlük kahve tüketiminiz nedir?

Hiç Bir Fincan İki Fincan 3 ve daha fazla

Soru 11: Sigara alışkanlığınız var mı?

EVET HAYIR

Yanıt EVET ise günlük sigara tüketiminin yaklaşık miktarı nedir? (Sigara sayısı 5 ve 5'den çok).....

Soru 12: Son bir ay içerisinde alkollü içecek tükettiniz mi?

EVET HAYIR

Yanıt EVET ise

- A. Bu süre içerisindeki haftalık alkol tüketiminin yaklaşık miktarı nedir?(3 kadeh yada daha fazla).....
- B. Aşağıdaki alkollü içeceklerden hangisini/hangilerini daha fazla tükettiniz?

Şarap Bira Raki Viski Diğer

Soru 13: Ortalama Kan basıncınız nedir?

Sistol:.....mmHg ve Diastol.....mmHg

Soru 14: Bayan katılımcılar için hamilelik veya emzirme durumu var mı?

Hamilelik EVET HAYIR

Emzirme EVET HAYIR

Soru 15: Herhangi bir karaciğer hastalığı geçirdiniz mi? (Sarılık, Siroz, karaciğer tümörü v.b.)

Soru 16: Herhangi bir böbrek hastalığı geçirdiniz mi? (Nefrit, Böbrek taşı, Böbrek tümörü, Böbrek iltihabı v.b.)

EVET HAYIR

Yanıt EVET ise hastalığın adı :

Soru 17: Egzersiz yapma alışkanlığınız var mı?

EVET HAYIR

Soru 18: Son 1 yıl içerisinde belirli bir ilaç tedavisi uygulandı mı?

EVET HAYIR

Yanıt EVET ise kullanılan ilacın/ilaçların türü ve hangi amaçla kullanıldığı.....

...

Soru 19. Son bir ay içerisinde aşağıdaki hazır gıdalardan hangilerini ne sıklıkla tükettiniz?

a)Hazır Çorba, hazır soslar (makarna ve pilav harcı v.b)

Hiç tüketmedim Az tükettim Çok tükettim

b) Patates, mısır, vb. Cipsi

Hiç tüketmedim Az tükettim Çok tükettim

c) bisküvi, kraker, kek, vb.

Hiç tüketmedim Az tükettim Çok tükettim

Soru 20. Son 3 gün içerisinde maden suyu tüketiminiz için aşağıdakilerden hangisini söyleyebilirsiniz?

Hiç tüketmedim Günde 1 şişe Günde 2 şişeden fazla

Soru 21. Son 3 gün içerisinde tuz (sofra tuzu) tüketiminiz için aşağıdakilerden hangisini söyleyebilirsiniz?

Az tükettim Çok tükettim

Soru 22. Son 3 gün içerisinde su tüketiminiz için aşağıdakilerden hangisini söyleyebilirsiniz?

Günde yarım litreden az Günde yarım litre Günde 1 litreden çok

EK-2**GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

- Bu çalışma insanlarda okratoksin A maruziyetinin araştırılması amacı ile insan idrar örneklerinde okratoksin A analizlerini kapsamaktadır.
- Bazı gıdaların kurutulması ve saklanması sırasında bu gıdalarda gelişen çeşitli küf türleri tarafından üretilen okratoksin A insanlarda, böbrek hastalıkları ve böbrek tümörlerine neden olabilirken bağışıklık sistemi üzerinde de olumsuz etkilere sahiptir. Ayrıca Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi (IARC) tarafından da insanda muhtemel kanserojen maddeler grubu olan 2B içerisinde sınıflandırılmıştır. Bu çalışma okratoksin A içeren gıdaların tüketilmesi sonucu vücuda alınan bu toksinin, bir vücut sıvısı olan idrardaki düzeyini ölçmek ve maruziyeti ortaya koymak amacı ile gerçekleştirilmektedir.
- Bu çalışmada insan maruziyetinin ortaya çıkarılması amacıyla Türkiye'nin belirli bölgelerinden toplanan insan idrar örneklerinin OTA içerikleri bakımından analiz edilmeleri ve böylece bu toksin açısından riskli bölgelerin saptanması planlanmaktadır. Ayrıca idrar örneklerinin toplanması sırasında gönüllülere uygulanacak bir anketle idrarda OTA düzeyleri ile bireysel farklılıklar ve yaşam kalitesi arasındaki ilişki ile bölge farklılıkları göz önünde bulundurularak araştırılacaktır.
- Çalışma esas olarak Türkiye'de proje süresince ve yine proje kapsamına alınan bölgelerdeki OTA'ya maruziyetin araştırılmasını kapsamaktadır. Bu amaçla Türkiye'de 4 ayrı bölgeden farklı antropometrik (boy, kilo, cinsiyet, yaş vb.) özellikler ve yaşam tarzlarına sahip 135 gönüllüden insan idrar örneğinin alınması planlanmıştır. Ayrıca örneklerin toplanması planlanan her bölgede idrarları alınacak bireylere aşağıda sunulan anket formundaki sorular yöneltilerek bireysel farklılıkların ve yaşam kalitesinin maruziyete etkisini değerlendirebilmek açısından da bilgi edinilmiş olacaktır. Yine bu araştırma sonucu elde edilecek veriler doğrultusunda OTA'nın

metabolizması üzerine etki eden ve deneklere uygulanacak olan anket soruları ile ortaya çıkabilecek bazı etkenlerin literatürdeki mevcut bilgiler ışığında değerlendirilmesi kapsam dahilinde tutulacaktır. Böylece toksine maruziyetin etkileri ile yaşam tarzı ve bazı antropometik özellikler arasında korelasyon oluşturulabilecektir.

- Araştırmaya sadece gönüllüler katılacaktır. Gönüllü, araştırmaya katılmama, ya da araştırma başladıktan sonra –devam etmek istemediği takdirde –çalışmadan ayrılma hakkına sahiptir. Bunun yanı sıra araştırmacı da gerekli gördüğü durumda gönüllünün rızasına bakmadan o kişiyi çalışma dışı bırakabilecektir.
- Projede yaklaşık 135 gönüllü ile çalışılacak, uygulanacak testlerle ilgili kendisi veya sosyal güvencesini sağlayan kurum hiçbir yük altına girmeyecektir.

“Türkiye’ nin Çeşitli Bölgelerinden Toplanan İnsan İdrar Örneklerinde Okratoksin A (OTA) Varlığının ve Düzeylerinin Immunoaffinite Kolon –Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Araştırılması” başlıklı çalışma bana sözlü olarak açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım. Çalışmaya kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün adı, soyadı :

Adresi :

İmzası :

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı, soyadı :

Adresi :

İmzası :

Rıza alma işlemine tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı, soyadı :

Görevi :

İmzası :

EK-3**İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KILAVUZUNUN ARAŞTIRICILAR
TARAFINDAN OKUNDUĞUNA DAİR BELGE**

“Türkiye’ nin Çeşitli Bölgelerinden Toplanan İnsan İdrar Örneklerinde Okratoksin A (OTA) Varlığının ve Düzeylerinin Immunoaffinite Kolon –Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Araştırılması” başlıklı çalışmaya katılan aşağıda imzası olan sorumlu ve yardımcı araştırmacılar olarak Sağlık Bakanlığı’nın 29.12.1995 tarih ve 51748 sayı ile yayınlamış olduğu İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzunu okuduğumuzu, gerekenleri yapacağımızı beyan ve taahhüt ederiz.

Sorumlu Araştırmacı

Prof. Dr. Asuman Karakaya

İmza**Yardımcı Araştırmacılar**

Uzm. Biy. Çiğdem Akdemir

İmza

Dr Şennur Özkaya

Biy. Alaattin Başaran

Uzm. Ezc. Özge Cemiloğlu Ülker

EK-4**ARAŞTIRMAYA KATILAN TÜM ÜNİTELERİN VE ELEMANLARIN
BİLGİLENDİRİLDİĞİNE DAİR BELGE****ÇALIŞMANIN BAŞLIĞI**

Türkiye' nin Çeşitli Bölgelerinden Toplanan İnsan İdrar Örneklerinde Okratoksin A (OTA) Varlığının ve Düzeylerinin Immunoaffinite Kolon –Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Araştırılması”

Yukarıda adı geçen çalışma hakkında gerekli bilgilerin bana İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu ve İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu doğrultusunda çalışmanın sorumlu araştırmacısı Prof. Dr. Asuman Karakaya tarafından iletildiğini beyan ederim.

Ad Soyad

Uzm. Biy. Çiğdem Akdemir

İmza

Dr Şennur Özkaya

Biy. Alaattin Başaran

Uzm. Ezc. Özge Cemiloğlu Ülker

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

AdıÇiğdem

SoyadıAKDEMİR

Doğum yeri ve yılıSiirt 1967

Medeni DurumuBekar

İletişim adresi ve telefonuKoruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Akay

Cad. 15/4 Kızılay/Ankara

E-posta adresicigdema@kkqm.gov.tr

II. Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Bölümü Biyokimya

Bölümü Yüksek Lisans Programı

Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Ziya Gökalp Lisesi

III. Unvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

Biyolog

Uzman Biyolog

IV. Üye olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Toksikoloji Derneği

V. Katıldığı Eğitim, Seminer ve Çalıştaylar

A. Yabancı Dil Kursu Bitirme Sertifikası(İngilizce), Devlet Memurları Yabancı Diller Eğitim Merkezi ve Akşam Sanat Okulu Müdürlüğü, 03.10.1994–30.06.1995 Ankara.

B. Yabancı Dil Sertifikası (İngilizce), Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi 03.07.1995–08.09.1995 Ankara.

C. Gıdalarda Mikotoksin Analizleri Eğitimi, JICA 04.02.2002–18.05.2002 Japonya.

D. GC,GCMS, LC, UV, CS Eğitimi, Shimadzu Corporation 16-22,03.2002 Kyoto, Japonya.

E. II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu 23–24.05.2003 İstanbul.

- F. Hızlı Analiz Metotları Teknikleri Çalıştayı, IRMM 22–25 Ocak 2005 Brüksel/Belçika.
- G. UPLC Kullanım Kursu WATERS 23.03.2005 Ankara.
- H. Akreditasyon ve Kalite Yönetiminin Önemi ve Yararları Serbest Mal Ticaretinde Uygunluk Değerlendirme Kuruluşlarının Rolü, BAM-ECA-TÜV Konsorsiyum, 22–24.02.2005 Ankara.
- İ. Test ve Kalibrasyon Laboratuvarlarına Yönelik Kalite ve Tekniğe İlişkin Akreditasyon Gereklilikleri BAM-ECA-TÜV Konsorsiyum, 11–15.04.2005.
- J. Kurutulmuş Meyvelerde Mikotoksin Analizleri Çalıştayı, RIVM, CSL, TÜBİTAK, R-BIOPHARM 24–25, 11,2005 İzmir.
- K. Sağlık Risk Değerlendirmeleri” Genel Prensipleri ve Uygulamaları “ CASCADE FP6 Projesi 11-15,03,2006 Karolinska Enstitüsü/ Stockholm/ İsveç.
- L. Sağlık Risk Değerlendirmeleri” Kanser, Endokrin Sisteme Zarar verenler ve Sinir Sistemi Toksinleri Üzerine Odaklı” CASCADE FP6 7–11,05.2007 Karolinska Enstitüsü/ Stockholm/ İsveç.

VI. Yer Aldığı Proje ve İzleme Programları

- A. Altıncı Çerçeve Projesi(FP6) “Genişleyen Avrupa’da Kimyasal Gıda Güvenliği Ağı Kurulması “ Akronimi SAFEFOODNET Türkiye Kontak Noktası 2005-2007.
- B. AB ve Tarım Bakanlığı arasında müşterek yürütülmekte olan “Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kurulması Projesi” proje koordinasyonu.

VII. Yayınları

- A. Ç.AKDEMİR, A. ALTINTAŞ;“ Ankara’ da İşlenen Sütlerde Aflatoksin M1 Düzeylerinin ve Varlığının Immünaffinite Kolon Clean-Up ve HPLC ile Araştırılması” Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. Cilt/Volume 51. Sayı/Number 3.2004.
- B. Ş. ÖZKAYA, Ç. AKDEMİR; “Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde Immunoaffinite Kolon–Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi(HPLC) Yöntemi ile Okratoksin A Tayini” Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Dergisi, Mayıs,2003.