

Fusarik Asit ve Enniatin-A Mikotoksinlerinin İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri (HUVEC) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sevcan MAMUR*¹

¹Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, 06830, Ankara

(Alınış / Received: 15.12.2017, Kabul / Accepted: 26.04.2018, Online Yayınlanma / Published Online: 31.05.2018)

Anahtar Kelimeler

Fusarik asit,
Enniatin-A,
Mikotoksin,
HUVEC hücre hattı,
MTT testi

Özet: Fusarik asit (FA) ve Enniatin-A (EN-A) *Fusarium* spp. cinsi mikotoksinler olup gıdaları ve yemleri kontamine edebilirler. Tahıllarda mikotoksin varlığı önemli sağlık sorunlarına yol açmakla birlikte ekonomik kayıplara da sebep olmaktadır. Bu çalışmada FA ve EN-A'nın potansiyel sitotoksik etkileri insan umbilikal ven endotel (HUVEC) hücre hattında 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT) testi ile incelenmiştir. Her iki mikotoksinin de farklı konsantrasyonları (FA için 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, 400 µg/mL, EN-A için 0.048, 0.098, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25 µg/mL) 24 ve 48 saat muamele sürelerinde uygulanmıştır. Sonuç olarak, FA ve EN-A'nın hücre canlılığını (%), her iki muamele süresinde de yüksek konsantrasyonlarda önemli düzeyde düşürdüğü belirlenmiştir. FA'nın 24 saatlik uygulamasında IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren) değerinin 150 µg/mL olduğu, 48 saatlik uygulamasında ise 200 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. EN-A'nın ise IC₅₀ değerinin 24 saatlik uygulamada 3.125 µg/mL, 48 saatlik uygulamada ise 1.56 µg/mL olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre FA ve EN-A'nın yüksek konsantrasyonlarda HUVEC hücrelerinde sitotoksik etki gösterdikleri gözlenmiştir. Ayrıca, EN-A mikotoksininin FA'dan daha fazla toksik etkiye sahip olduğu söylenebilir. Bu sitotoksik etki, hücre döngüsünde ve hücre proliferasyonunda yavaşlamaya dolayısıyla DNA replikasyonun bozulmasına ve hücrelerde apoptozise neden olabilir.

Evaluation of Cytotoxic Effects of Mycotoxins Fusaric Acid and Enniatin-A on Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Keywords

Fusaric acid,
Enniatin-A,
Mycotoxin,
HUVEC cell line,
MTT assay

Abstract: Fusaric acid (FA) and Enniatin-A (EN-A) are *Fusarium* spp. mycotoxins, which can contaminate food and feed. The presence of mycotoxins in cereal commodities could cause significant health problems, as well as economic losses. In this study, the potential cytotoxic effects of FA and EN-A were investigated in human umbilical vein endothelial (HUVEC) cell line using 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Both mycotoxin were treated with different concentrations (for FA 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, and 400 µg/mL and for EN-A 0.048, 0.098, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25 µg/mL) for 24 and 48 hours treatment period. As a result, FA and EN-A significantly decreased the cell viability (%) at higher concentrations in both treatment times. The half of inhibitory (IC₅₀) value of FA was determined as 150 µg/mL for 24 h and as 200 µg/mL for 48h treatment. IC₅₀ value of EN-A was determined as 3.125 µg/mL for 24 h and as 1.56 µg/mL for 48h treatment. This result indicated that FA and EN-A have cytotoxic effect on HUVEC cells at higher concentrations. Furthermore, it can be said that EN-A is a more cytotoxic activity than FA. This cytotoxic effect may lead to decelerating the cell cycle and cell proliferation thus causing impaired DNA replication and apoptosis in the cells.

*İlgili yazar: smamur@gazi.edu.tr

1. Giriş

Gıda, tahıl ve yemleri yaygın olarak kontamine eden mikotoksinler çeşitli mantar türleri tarafından oluşturulan ikincil metabolitlerdir [1]. Koşullar uygun olduğu takdirde, tarımsal ürünlerde hasat, taşıma ve depolama sırasında mikotoksinler meydana gelebilmektedir [2]. Günümüzde insanlar mikotoksinlere beslenme kaynaklı ya da çevresel faktörlerle bağlı olarak doğrudan ya da dolaylı olarak maruz kalmaktadırlar [3]. Mikotoksinler yaygın olarak tahıl ürünlerinde ve ayrıca, başta mısır olmak üzere fındık, antep fıstığı, kuru incir, siyah zeytin, kırmızı toz ve pul biber, süt ve süt ürünlerinde kontaminasyona sebep olabilmektedirler [4]. Mikotoksinler çeşit ve miktarlarına bağlı olarak, kontamine gıda ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda sağlık problemleri oluşturabilmekte ve hastalıklara yol açabilmektedirler [5, 6]. Bu toksinleri içeren gıdaların alınması sonucu insan ve hayvanlarda meydana gelen sağlık problemleri mikotoksikozis olarak adlandırılmaktadır [7]. Yapılan bazı çalışmalarda mikotoksinlerin nefrotoksik, hepatoksik, mutajenik, karsinojenik ve immün baskılayıcı özellikleri rapor edilmiştir [7, 8]. Ayrıca mikotoksin kontaminasyonunun dünya çapında yıllık olarak milyarlarca dolara ulaşan ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir [1].

Mikotoksin oluşumunun temel kaynağı, gıdaları yaygın olarak kontamine eden *Fusarium*, *Penicillium* ve *Aspergillus* gibi mantar cinsleridir [9]. Başlıca *Fusarium* toksinleri trikotesenler, fumonisinler ve zearalenone olup, bunların dışında fusarik asit, moniliformin, fusaproliferin, fusariosin, fusarin C, wortmannin, equisetin, enniatinler ve beauvericin diğer mikotoksinlerdir [10, 11].

Bu çalışmada sitotoksik potansiyeli incelenen Fusarik asit (FA) (5-bütülpikolinik asit) etkili bir fitotoksin olup [12] *Fusarium moniliforme* ve diğer *Fusarium* cinslerine ait mantarlardan oluşur [13, 14]. İlk olarak Yabuta ve arkadaşları [15] tarafından *Fusarium hetesporium*'un laboratuvar kültürü sırasında keşfedilmiştir. FA özellikle tahıllarda ve yaygın olarak mısırdaki, mısır içeren gıdalarda bulunmaktadır [16]. Enniatin-A (EN-A), *Fusarium* cinsine ait mantarlardan oluşan Enniatin türü bir mikotoksindir. EN-A, tüm dünyada tahıllarda ve özellikle de mısırdaki kontaminasyonlara yol açmaktadır. Enniatin türlerinin antifungal, antibakteriyal, antimalarial, antihelmintik ve bağışıklık sistemini düzenlemek gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir [17-19]. Bazı araştırmacılar ise Enniatin'in potansiyel sitotoksik aktivitesinin antikanser ilaç geliştirilmesinde bir aday olabileceğini vurgulamışlardır [20-22].

Elde edilen verilere göre, FA ve EN-A mikotoksinlerinin HUVEC hücre hattında sitotoksik potansiyelini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte diğer hücre hatları ile yapılan

çalışmalar bulunmaktadır. Vesonder ve arkadaşları [23] FA'nın köpek böbrek fibroblast hücrelerinde ($>10 \mu\text{g/mL}$), sıçan hepatoma hücrelerinde ($>50 \mu\text{g/mL}$), Çin hamster ovaryum hücrelerinde (10 and $25 \mu\text{g/mL}$) ve MyCoy fare fibroblast hücrelerinde ($>25 \mu\text{g/mL}$) Neutral red testi ile sitotoksik etkili olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada FA'nın $500 \mu\text{M}$ konsantrasyonunun normal WI-38 fibroblast hücrelerinde, insan kolorektal adenokarsinoma (SW48, SW480, SW742) ve insan memeli adenokarsinoma (MDA-MB-468) hücrelerinde sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir [24].

EN-A ve türevleri ile sitotoksikitenin farklı hücre hatlarında değerlendirildiği birkaç çalışma mevcuttur. Ivanova ve arkadaşları [20] EN-A'nın MRC-5 (IC_{50} 3.5-3.8 mM) ve HepG2 (IC_{50} 7.3-9.4 mM) hücrelerinde Alamar Blue testi ile sitotoksik etkili olduğunu belirtmişlerdir. IC_{50} değerinin EN-A için 0.8 mM, Enniatin B için ise 3.6 mM olduğunu gözlemlemişlerdir [20]. Meca ve arkadaşları [25], EN-A'nın 24 ve 48 saat muamele sürelerinde insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma (Caco-2), insan karcinögen karsinoma (Hep-G2) ve insan kolon karsinoma (HT-29) hücre hatlarında MTT hücre canlılığı testi ile sitotoksik etkili olduğunu belirtmişlerdir. 24 saatlik uygulamada, EN-A'nın Caco-2 ($19.5 \pm 4.1 \mu\text{M}$), HT-29 ($16.8 \pm 4.3 - 26.2 \pm 6.7 \mu\text{M}$) ve Hep-G2 ($23.4 \pm 5.6 - 26.2 \pm 7.6 \mu\text{M}$) hücre hatlarında düşük sitotoksik etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. 48 saatlik uygulamada ise, EN-A'nın HT-29 ($8.2 \pm 1.8 \mu\text{M}$), Caco-2 ($9.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$) ve Hep-G2 ($11.4 \pm 4.6 \mu\text{M}$) hücre hattında anlamlı düzeyde sitotoksik etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Lu ve arkadaşları [26], EN-A'nın Çin hamsteri yumurtalık hücre hattında (CHO-K1) MTT hücre canlılığı testi ile, IC_{50} değerini 24 saatlik uygulamada $>7.5 \mu\text{M}$; 48 saatlik uygulamada için $2.83 \pm 0.49 \mu\text{M}$, 72 saatlik uygulama için ise $3.33 \pm 0.22 \mu\text{M}$ olarak tespit etmişlerdir. Enniatin'in sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olduğu belirtilmiştir [26].

Bu çalışmada, FA ve EN-A'nın HUVEC hücreleri üzerine potansiyel sitotoksik etkilerinin MTT hücre canlılığı testi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. HUVEC hücreleri, *in vivo* endotel tabakasına oldukça iyi bir modeldir. Sitotoksik etkinin değerlendirilmesinde, HUVEC hücreleri sağlıklı ve insan kaynaklı hücre hattı olduğu, endotel hücrelerinin temel özelliklerini taşıdığı ve kolay ve ucuz elde edilebilir olduğu için tercih sebebidir [27, 28]. MTT hücre canlılığı testi sitotoksik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan testlerden biridir [29].

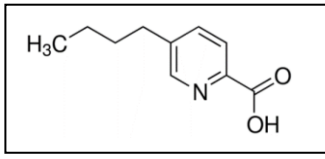
2. Materyal ve Metot

2.1. Test materyali ve kimyasallar

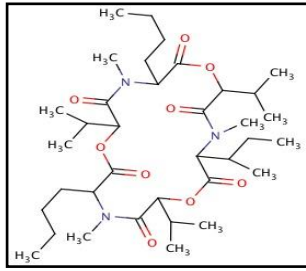
Fusarik asit (FA) ve Enniatin-A (EN-A) Sigma-Aldrich'den; Dulbecco's Modified Eagle Medium with

phenol red (DMEM) (Katolog. No. F0445), Dulbecco's Modified Eagle Medium without phenol red (DMEM) (Katolog. No. F0475), PBS (Katolog No. L1825), fetal bovine serum (FBS) (Katolog. No. S0613), penicillin/streptomycin (Katolog. No. A2213), L-glutamine (Katolog. No. K0283), trypsin (Katolog. No. L2163) Biochrome'den, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Katolog No. M2128) ve DMSO for cell culture (Katolog. No. D2650) Sigma'dan temin edilmiştir.

Test materyalleri olan FA ve EN-A mikotoksinlerinin yapısal formülleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Her iki mikotoksin de, besiyeri hacminin (%) 0.5 geçmeyecek şekilde Dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülmüş ve uygulanacak konsantrasyonlar hazırlanmıştır.



Şekil 1. Fusarik asitin yapısal formülü [30]



Şekil 2. Enniatin-A'nın yapısal formülü [31]

2.2. İnsan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) hattının geliştirilmesi

HUVEC hücre hattı, standart koşullarda (nemlendirilmiş, %5 CO₂/ %95 hava, 37°C) 75 cm² ya da 25 cm² kültür flasklarında %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve 2mM L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) içerisinde hücreler istenilen sayıya ulaşıncaya kadar çoğaltılmıştır.

2.3. MTT hücre canlılığı testi

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılığı testinde, Mossman [32] metodu bazı modifikasyonlarla izlenmiştir. Geliştirilen HUVEC hücreleri, her bir kuyucuğa 5x10³ hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu plakalara alınmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandığında FA'nın 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonları; EN-A'nın ise 0.048, 0.098, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125 ve 6.25 µg/mL konsantrasyonları kuyucuklara ekilip, hücrelere 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Ayrıca hiçbir uygulama içermeyen kontrol kuyucuğu ve %0.5

DMSO içeren çözücü kontrol kuyucuğu da bulundurulmuştur. İnkübasyon süresi bitiminde, tüm kuyucuklara MTT çözeltisinden ilave edilmiştir. Daha sonra hücreler 2-4 saat kadar 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandığında tüm kuyucuklara DMSO ilave edilerek kristallerin çözünmesi sağlanmıştır. Tüm uygulamalar için absorbans (ABS) değerleri 570 nm dalga boyunda okutulmuş ve belirlenmiştir. Tüm bu işlemler farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen üç farklı ABS değerinin ortalaması alınarak, ortalama ABS değerleri tespit edilmiştir. Bu değerlere göre FA ve EN-A'nın nisbi canlılık (% canlılık) değerleri ve hücrelerin %50'sini öldüren IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

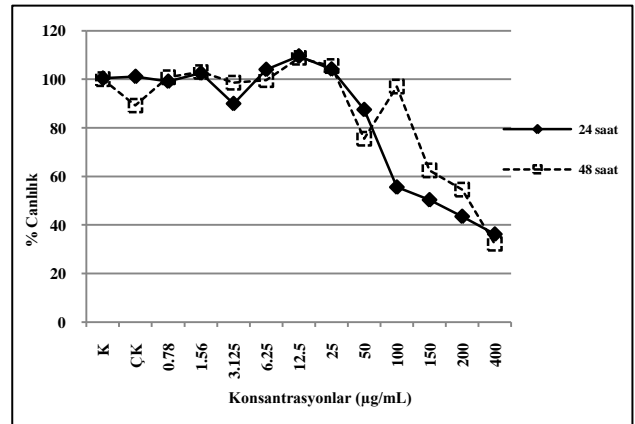
2.4. İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmede, SPSS 15.0 bilgisayar programında One Way ANOVA-Dunnett testi uygulanmış ve P<0.05'in altındaki değerler anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca bu araştırmada doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 15.0 programı aracılığıyla regresyon analizi yapılmıştır.

3. Bulgular

3.1. Fusarik asit sonuçları

Bu araştırmada Fusarik asit (FA)'in HUVEC hücreleri üzerine potansiyel sitotoksik etkisi, MTT hücre canlılığı testi ile değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir. FA'nın 24 saatlik uygulamasında, 100, 150, 200 ve 400 µg/mL'lik konsantrasyonlarda kontrole (r=-0.833) ve çözücü kontrole (r=-0.835) göre hücre canlılığını anlamlı oranda ve doza bağlı olarak azaltarak sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise, FA'nın uygulanan en yüksek üç konsantrasyonunda (150, 200 ve 400 µg/mL) kontrole (r=-0.787) ve çözücü kontrole göre (r=-0.736) (150 µg/mL hariç) hücre canlılığını önemli düzeyde doza bağlı olarak azalttığı tespit edilmiştir. IC₅₀ değerinin 24 saatlik uygulamada 150 µg/mL, 48 saatlik uygulamada ise 200 µg/mL olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. FA'nın HUVEC hücreleri üzerine (%) canlılık değerleri

Tablo 1. FA' nın HUVEC hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

	Konsantrasyon (µg/mL)	N	Mean±SS	
			24 saat	48 saat
K	0.00	3	1.356±0.102	1.314±0.063
ÇK	0.5 (%) DMSO	3	1.365±0.091	1.172±0.027
FA	0.78	3	1.338±0.124	1.325±0.124
	1.56	3	1.384±0.075	1.354±0.084
	3.125	3	1.214±0.186	1.295±0.172
	6.25	3	1.404±0.061	1.310±0.053
	12.5	3	1.479±0.164	1.430±0.105
	25	3	1.406±0.039	1.385±0.205
	50	3	1.181±0.137	0.992±0.224
	100	3	0.750±0.005 * a	1.275±0.376
	150	3	0.679±0.043 * a #	0.820±0.087 *
	200	3	0.587±0.089 * a	0.717±0.033 * a #
	400	3	0.488±0.134 * a	0.423±0.041 * a

FA: Fusarik asit, K: kontrol, ÇK: çözücü kontrol, SS: standart sapma

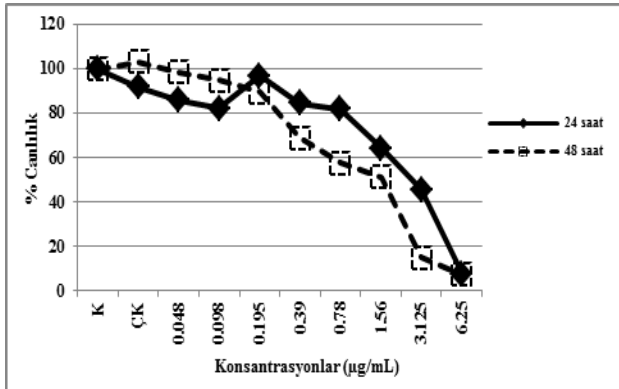
* Kontrole göre P<0.05 düzeyinde anlamlı (One way ANOVA-Dunnet Test)

a Çözücü kontrole göre P<0.05 düzeyinde anlamlı (One way ANOVA-Dunnet Test)

IC₅₀ değeri

3.2. Enniatin-A sonuçları

Tablo 2'de Enniatin-A (EN-A)'nın HUVEC hücre hattında MTT hücre canlılığı testi sonuçları verilmiştir. Buna göre, 24 saatlik uygulamada EN-A'nın 0.098-6.25 µg/mL konsantrasyonlarının (0.195 ve 0.39 µg/mL hariç) kontrole göre (r=-0.844); 1.56, 3.25 ve 6.25 µg/mL konsantrasyonlarının ise çözücü kontrole (r=-0.817) göre hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı oranda ve doza bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise; EN-A çalışılan en yüksek beş konsantrasyonda (0.39-6.25 µg/mL) hücre canlılığını kontrole (r=-0.959) ve çözücü kontrole (r=-0.965) göre önemli oranda ve doza bağlı olarak azaltmıştır. EN-A'nın IC₅₀ değerinin; 24 saatlik uygulamada 3.125 µg/mL konsantrasyon 48 saatlik uygulamada ise 1.56 µg/mL 'lik konsantrasyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. EN-A'nın HUVEC hücreleri üzerine (%) canlılık değerleri

Tablo 2. EN-A'nın HUVEC hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

	Konsantrasyon (µg/mL)	N	Mean±SS	
			24 saat	48 saat
K	0.00	3	1.505± 0.058	1.551±0.056
ÇK	0.5 (%) DMSO	3	1.382 ± 0.060	1.602±0.014
EN-A	0.048	3	1.294 ± 0.260	1.528±0.126
	0.098	3	1.236 ± 0.082 *	1.470±0.174
	0.195	3	1.457 ± 0.040	1.387±0.288
	0.39	3	1.275 ± 0.010	1.069±0.024 * a
	0.78	3	1.233 ± 0.025 *	0.895±0.151 *a
	1.56	3	0.967± 0.057 * a	0.798±0.067 * a #
	3.125	3	0.689 ± 0.157 * a #	0.234±0.152 * a
	6.25	3	0.117 ± 0.002 * a	0.117±0.001 * a

EN-A: Enniatin-A, K: kontrol, ÇK: çözücü kontrol, SS: standart sapma

* Kontrole göre P<0.05 düzeyinde anlamlı (One way ANOVA-Dunnet Testi)

a Çözücü kontrole göre P<0.05 düzeyinde anlamlı (One way ANOVA-Dunnet Testi)

IC₅₀ değeri

4. Tartışma ve Sonuç

Mikotoksinlerin gıdalarda yol açtığı kontaminasyon, gıda güvenliğinin sağlanması ve toplum sağlığının korunması açısından kontrol altına alınması gereken önemli sorunlardan biridir. Ülkemizin coğrafyası ve iklim şartları göz önüne alındığında, pek çok mikotoksin üreten küflerin üremesi ve toksin üretmesi için koşullar elverişlidir. Ancak tarımsal üretim açısından önemli bir potansiyele sahip olan ülkemizde, tarım ürünlerinde *Fusarium* toksinlerinin risk analizleri ile ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamakla birlikte, yapılan çalışmalarda mikotoksin maruziyetinin insan sağlığı üzerine pek çok akut, kronik [6] ve karsinojenik etkilerinin de olabileceği belirtilmiştir [33]. Mikotoksinlerin sınır değerleri dünya çapında birçok ülkede belirlenmiştir.

Avrupa Birliği, mikotoksinlerin maximum seviyeleri hakkında Komisyon Tüzüğü (No: 1881/2006) tarafından hazırlanan kapsamlı gıda düzenlemesi yönetmeliğini uygulamaktadır [34]. Ancak gıdalarda sonradan belirlenen ve miktarlarında artış gözlenmiş mikotoksinler olan Beauvercin, Fusarik asit, Moliniformin ve Enniatinler'in maximum seviyeleri henüz açıkça belirlenmemiştir [1]. Bu nedenle, toplum sağlığı açısından son derece önemli olan bu konuda, ülkemizde ve dünyada toksisite çalışmalarının artırılması ve bu maddelerin risk seviyelerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Bu araştırmada gıdaları yaygın olarak kontamine eden *Fusarium* cinsi mikotoksinler olan FA ve EN-A'nın potansiyel sitotoksik etkileri HUVEC hücrelerinde MTT hücre canlılığı testi ile incelenmiştir. Çeşitli kimyasal ajanların

sitotoksitesinin belirlenmesinde MTT hücre canlılığı testi yaygın olarak kullanılmakta ve hızlı ve duyarlı sonuçlar vermektedir [29, 35]. Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrogenaz (SDH) enzimi, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazan kristallerini oluşturmasına dayanır [29, 36]. Aktive olmuş hücreler bölünmenin artışıyla birlikte formazan üretirler ve bu olay aktif olan mitokondrinin sayesinde gerçekleşir. Yapılan spektrofotometrik ölçüm, kültürdeki canlı hücrelerin metabolik aktivitelerini göstermektedir [37, 41].

Yapılan analiz sonuçlarına göre, bu çalışmada kullanılan her iki mikotoksinin de, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, HUVEC hücrelerinde önemli düzeyde sitotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir. FA'nın IC₅₀ değerinin 24 saatlik uygulamada 150 µg/mL, 48 saatlik uygulamada ise 200 µg/mL olduğu gözlenmiştir. Enniatin-A'nın IC₅₀ değerinin ise 24 saatlik uygulamada 3.125 µg/mL, 48 saatlik uygulamada ise, 1.56 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Bu bulgulara göre; EN-A'nın, FA'ya göre daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Literatüre göre, FA ve EN-A'nın HUVEC hücrelerinde potansiyel sitotoksik etkisini MTT testi ile araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, FA'nın sitotoksik aktivitesiyle ilgili çeşitli hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmaların sonuçları ile örtüşmektedir [23, 24]. Fernandez-Pol ve arkadaşları [24], FA'nın 500 µM konsantrasyonunun normal WI-38 fibroblast hücre hattında, insan kolorektal adenokarsinoma (SW48, SW480, SW742) ve insan memeli adenokarsinoma (MDA-MB-468) hücre hatlarında sitotoksik etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca FA'nın WI-38 fibroblast hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada; FA'nın köpek böbrek fibroblast hücrelerinde (>10 µg/mL), sıçan hepatoma hücrelerinde (>50 µg/mL), Çin hamster ovaryum hücrelerinde (10 and 25 µg/mL) ve MyCoy fare fibroblast hücrelerinde (>25 µg/mL) Neutral red testi ile sitotoksik etkili olduğunu belirtmişlerdir [23]. FA'nın subkronik etkisini araştıran bir *in vivo* çalışmada ise, sıçanlarda 0, 20, 100 ve 400 ppm'lik konsantrasyonlarda, kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarında önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir [14].

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre EN-A'nın HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, farklı hücre hatlarında yapılan mevcut çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Ivanova ve arkadaşları [20], Enniatin A'nın MRC-5 (IC₅₀ 3.5-3.8 mM) ve HepG2 (IC₅₀ 7.3-9.4 mM) hücre hatlarında Alamar Blue testi ile sitotoksik etkili olduğunu belirtmişlerdir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada ise, EN-A'nın 24 saatlik uygulamasında, insan epitelial kolorektal adenokarsinoma (Caco-2) (IC₅₀, 19.5±4.1 µM), insan kolon karsinoma (HT-29) (IC₅₀, 16.8±4.3-26.2±6.7 µM) ve insan karaciğer karsinoma (Hep-G2) (IC₅₀,

23.4±5.6-26.2±7.6 µM) hücre hatlarında MTT hücre canlılığı testi ile düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu; 48 saatlik uygulamada ise, EN-A'nın (IC₅₀, 8.2±1.8-11.4±4.6 µM) önemli düzeyde sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [25]. Lu ve arkadaşları [26], EN-A'nın ve türevlerinin (EN-A1, B, B1) sitotoksik potansiyellerini MTT hücre canlılığı testi ile Çin hamsteri yumurtalık hücre hattında (CHO-K1) 24, 48 ve 72 saat muamele sürelerinde araştırmışlardır. Mikotoksinlerin IC₅₀ değerleri 24 saatlik uygulamada EN-A için >7.5 µM; EN-A1 için 8.8±2.29 µM, EN-B için 11.0±2.65 µM, EN-B1 için 4.53±1.23 µM olarak belirlenmiştir. 48 saatlik uygulamada ise IC₅₀ değerleri, Enniatin A için 2.83±0.49 µM; EN-A1 için 1.74±0.18 µM, EN-B için 2.44±0.51 µM ve EN-B1 için 2.64±0.18 µM olarak tespit edilmiştir. Mikotoksinlerin 72 saat muamelesinde ise IC₅₀ değerleri, EN-A için 3.33±0.22 µM; EN-A1 için 1.65±0.06 µM, EN-B için 2.80±0.16 µM ve EN-B1 için 2.47±0.29 µM olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar Enniatin'in sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca bazı çalışmalarda EN-A'nın sitotoksik aktivitesinin antikanser ilaç geliştirilmesinde bir aday olabileceğini vurgulanmıştır [21, 22]. Bu mikotoksinin potansiyel sitotoksik aktivitesi çeşitli kanser hücreleri üzerinde incelenmelidir.

FA ve EN-A mikotoksinlerinin yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye nasıl yol açtıklarının mekanizması henüz tam olarak bilinmemesine rağmen, bazı çalışmalarda mikotoksinlerin DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonuna yol açtıkları belirtilmiştir [38]. FA'nın DNA hasarını artırıcı, DNA sentezini ve tamirini inhibe edici etki yaptığı [24, 39] ve ayrıca normal ve kanserli hücrelerde potansiyel antiproliferatif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [39]. Daha önce yapılan çalışmalar, FA'nın çeşitli hücrelerdeki sitotoksik aktivitesini muhtemel apoptozis mekanizmalarına bağlamaktadırlar [40-44]. Pek çok çalışmada FA'nın antioksidan enzimleri azaltarak ve reaktif oksijen türlerini artırarak, oksidatif stresi artırdığı belirtilmiştir [16, 44-46]. FA'nın demir şelasyonu ve Fenton reaksiyonunu artırarak oksidatif strese yol açtığı belirlenmiştir [44, 47]. FA'nın ATP sentez aktivitesini inhibe ederek doğrudan elektron taşıma sistemini baskıladığı ve dolayısıyla mitokondriyal enzimleri baskılayabileceği açıklanmıştır [16]. Enniatin-A'nın ise toksik etkiye nasıl yol açtığına mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak Enniatin mikotoksinlerinin hücre ölümünü, öncelikle mitokondriyal yolla apoptozisi indükleyerek [19, 21] ya da nekroza dayalı lizozomal hasarla artırdıkları belirtilmiştir [48 ve 49]. Bazı çalışmalarda da Enniatin'in oksidatif stresi artırdığı vurgulanmıştır [50, 51].

Sonuç olarak, bu çalışmada FA ve EN-A'nın her iki uygulama süresinde de özellikle çalışılan yüksek konsantrasyonlarda HUVEC hücreleri üzerinde

sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sitotoksik etki, DNA ve protein sentezinde inhibisyona, apoptoza ya da nekroza yol açabilir [52]. Ayrıca sitotoksik etkili olduğu belirlenmiş mikotoksinlerle canlıların kısa süreli maruziyeti sonucunda akut toksisite görülebileceği gibi; uzun süreli maruziyetinde, bu maddelerin vücutta birikim yapmasıyla immün sistem yetersizliğinden kansere kadar uzanan pek çok kronik etkiler de görülebilir [33, 53, 54]. Bu etkiyi organizma düzeyinde değerlendirebilmek için *in vivo* araştırmalarının da gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Gıda güvenliğinin sağlanması ve dolayısıyla toplum sağlığının korunması için; tarımsal ürünlerin uygun koşullarda depolanması, mikotoksin analizlerinin rutin olarak ve uygun fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle sık sık yapılması ve mikotoksin kalıntılarının giderilmesi için çeşitli önlemlerin alınması önemlidir.

Kaynakça

- [1] Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V.C., Logrieco, A.F., Mulè, G. 2017. Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins*, 9, 111.
- [2] Patriarca, A., Pinto, V.F. 2017. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14, 50–60.
- [3] Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. 2008. Moniliformin Mikotoksininin In Vitro Genotoksik Etkileri. *SAÜ Fen Edebiyat Dergisi*, 1-14.
- [4] Oruç, H.H. 2005. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24, 1-2-3-4, 105-110.
- [5] Solhaug, A., Karlsøen, L.M., Holme, J.A., Kristoffersen, A.B., Eriksen, G.S. 2016. Immunomodulatory effects of individual and combined mycotoxins in the THP-1 cell line. *Toxicology in Vitro*, 36, 120–132.
- [6] Nguyen, P.A., Strub, C., Fontana, A., Schorr-Galindo, S. 2017. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control* 104, 10–27.
- [7] Öksüztepe, G., Erkan, S. 2016. Mikotoksinler ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5(2), 190-195.
- [8] Rocha, M.E.B., Freire, F.D.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165, 2014.
- [9] Stanciu, O., Juan, C., Miere, D., Loghin, F., Manes, J. 2017. Occurrence and co-occurrence of Fusarium mycotoxins in wheat grains and wheat flour from Romania. *Food Control*, 73, 147-155, 2017.
- [10] Scott, P.M. 2004. Other mycotoxins, *Mycotoxins in Food - Detection and Control*. Editors: Magan N., Olsen M. Cambridge, CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., 406-427.
- [11] Springler, A. Vrubel, G.J., Mayer, E., Schatzmayr, G., Novak, B. 2016. Effect of Fusarium-Derived Metabolites on the Barrier Integrity of Differentiated Intestinal Porcine Epithelial Cells (IPEC-J2). *Toxins*, 8, 345.
- [12] Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A., Moretti, A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by Fusarium proliferatum isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118 (2), 165-172.
- [13] Smith, T.K. 1992. Recent advances in the understanding of Fusarium trichothecene mycotoxins. *Journal of Animal Science*, 70 (12), 3989-3993.
- [14] Voss, K.A., Porter, J. K., Bacon, C.W., Meredith, F. I., Norred, W.P., 1999. Fusaric acid and modification of the subchronic toxicity to rats of fumonisins in F. moniliforme culture material”, *Food and Chemical Toxicology*, 37, 853-861.
- [15] Yabuta, T., Kambe, K. Hayashi, T. 1937. Biochemistry of the bakanaefungus. I. Fusarinic acid, a new product of the bakanae fungus. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 10, 1059-1068.
- [16] Abdul, N.S., Nagiah, S., Chuturgoon, A.A. 2016. Fusaric acid induces mitochondrial stress in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Toxicon*, 119, 336-344.
- [17] Fornelli, F., Minervini, F., Logrieco, A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (Spodoptera frugiperda) cell line (SF 9). *Journal of Invertebrate Pathology*, 85, 74-79.
- [18] Behm, C., Degen, G.H., Follmann, W. 2009. The Fusarium toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity in vitro. *Molecular Nutrition&Food Research*, 53, 423-430.
- [19] Tonshin, A.A., Teplova, V.V., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S. 2010. The Fusarium mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis. *Toxicology*, 276, 49-57.
- [20] Ivanova, L., Skjerve, E., Eriksen, G.S., Uhling, S. 2006. Cytotoxicity of enniatins A, A1, B, B1, B2 and B3 from Fusarium avenaceum. *Toxicon*, 47, 868-876.
- [21] Dornetshuber, R., Heffeter, P., Kamyar, M.R., Peterbauer, T., Berger, W., Lemmens-Gruber, R. 2007. Enniatin exerts p53-dependent cytostatic

- and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells. *Chemical Research in Toxicology*, 20, 465-473.
- [22] Watjen, W., Debbab, A., Hohlfeld, A., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Edrada, R.A., Ebel, R., Hakiki, A., Mosaddak, M., Totzke, F., Kubbutat, M., Proksch, P. 2009. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. *Molecular Nutrition&Food Research*, 53, 431-440.
- [23] Vesonder, R.F., Gasdorf, H., Peterson, R.E. 1993. Comparison of the cytotoxicities of *Fusarium* metabolites and *Alternaria* metabolite AAL-toxin to cultured mammalian cell lines. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24 (4), 473-477.
- [24] Fernandez-Pol, J.A., Klos, D.J., Hamilton, P.D. 1993. Cytotoxic activity of fusaric acid on human adenocarcinoma cells in tissue culture” *Anticancer Research*, 13(1), 57-64.
- [25] Meca, G., Font, G., Ruiz, M.J. 2011. Comparative cytotoxicity study of enniatins A, A1, A2, B, B1, B4 and J3 on Caco-2 cells, Hep-G 2 and HT-29. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2464-2469.
- [26] Lu, H., Fernández-Franzón, M., Font, G., Ruiz, M.J. 2013. Toxicity evaluation of individual and mixed enniatins using an in vitro method with CHO-K1 cells. *Toxicology In Vitro*, 27, 672-680.
- [27] Yazır, Y. 2004. İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre kültüründe, vasküler endotelial büyüme faktörünün, vasküler hücre adezyon molekülü-1 ve intersellüler adezyon molekülü-1 ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi. KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, Doktora Tezi.
- [28] Yazır, Y., Dalçık, H., 2012. Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü. *Koşuyolu Kalp Dergisi*, 15(3),137-142.
- [29] Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L. 2016. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual*, 1-31.
- [30] https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/CofAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/F6/F6513/F6513BULK____SIGMA____.pdf (Erişim Tarihi: 29.04.2018).
- [31] <https://www.scbt.com/scbt/product/enniatin-a-2503-13-1>. (Erişim Tarihi: 07.05.2018).
- [32] Mossman, T. 1983. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- [33] Ruyck, K.D., Boevre, M.D. Huybrechts, I., Saeger, S.D. 2015. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 32-41.
- [34] Commission Regulation 2006/1881/EC of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Food stuffs. Available online: <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1881&from=en> (accessed on 03 November 2016).
- [35] Uzun, İ. H., Bayındır, F. 2011. Dental materyallerin biyouyumluluk test yöntemleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28(2), 115-22.
- [36] Slater, T.F., Sawyer, B. Straeuli, U. 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 77, 383-393.
- [37] Fotakis, G., Timbrell, J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- [38] Berek, L., Petri, I.B., Mesterhazy, A., Téren, J., Molnár, J. 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicology In Vitro*, 15(1), 25-30.
- [39] Stack, B.C., Md, F., Hansen, J.P., Ruda, J.M., Jaglowski, J., Shvidler, J., Hollenbeak, C.S. 2004. Fusaric acid: a novel agent and mechanism to treat HNSCC. *Otolaryngol Head and Neck Surgery*, 131, 54-60.
- [40] Ogata, S., Inoue, K., Iwata, K., Okumura, K., Taguch, H. 2001. Apoptosis induced by picolinic acid-related compounds in HL-60 cells. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 65, 2337-233.
- [41] Jaglowski, J.R., Stack B.C. 2006. Enhanced growth inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck by combination therapy of fusaric acid and paclitaxel or carboplatin. *Cancer Letters*, 243, 58-63.
- [42] Ruda, J.M., Beus, K.S., Hollenbeak, C.S., Wilson, R.P., Stack, B.C. 2006. The effect of single agent oral fusaric acid (FA) on the growth of subcutaneously xenografted SCC-1 cells in a nude mouse model. *Investigational New Drugs*, 24, 377-381.
- [43] Ye, J., Montero, M., Stack, B.C. 2013. Effects of fusaric acid treatment on HEp2 and docetaxel-resistant HEp2 laryngeal squamous cell carcinoma. *Chemotherapy*, 59, 121-128.

- [44] Iwahashi, H., Kawamori, H., Fukushima, K. 1999. Quinolinic acid, α -picolinic acid, fusaric acid, and 2,6-pyridinedicarboxylic acid enhance the Fenton reaction in phosphate buffer. *Chemico-Biological Interactions*, 118, 201-215.
- [45] Singh, V.K., Upadhyay, R.S. 2014. Fusaric acid induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Solanum lycopersicum* L. Singh and Upadhyay *Botanical Studies*, 55, 66.
- [46] Jiao, J., Sun, L., Zhou, B., Gao, Z., Hao, Y., Zhu, X., Liang, Y. 2014. Hydrogen peroxide production and mitochondrial dysfunction contribute to the fusaric acid-induced programmed cell death in tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1197-1203.
- [47] Hirai, T., Fukushima, K., Kumamoto, K., Iwahashi, H. 2005. Effects of some naturally occurring iron ion chelators on in vitro superoxide radical formation. *Biological Trace Element Research*, 108, 77-85.
- [48] Gammelsrud, A., Solhaug, A., Dendele, B., Sandberg, W.J., Ivanova, L., Kocbach Bolling, A., Lagadic-Gossmann, D., Refsnes, M., Becher, R., Eriksen, G., Holme, J.A. 2012. Enniatin B-induced cell death and inflammatory responses in RAW 267.4 murine macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261, 74-87.
- [49] Ivanova, L., Egge-Jacobsen, W.M., Solhaug, A., Thoen, E., Faeste, C.K. 2012. Lysosomes as a possible target of enniatin B-induced toxicity in Caco-2 cells. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 1662-1674.
- [50] Dornetshuber, R., Heffeter, P., Sulyok, M., Schumacher, R., Chiba, P., Kopp, S., Koellensperger, G., Micksche, M., Lemmens-Gruber, R., Berger, W. 2009. Interactions between ABC-transport proteins and the secondary *Fusarium* metabolites enniatins and beauvericin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 904-920.
- [51] Prosperini, A., Juan-Garcia, A., Font, G., Ruiz, M.J. 2013. Reactive oxygen species involvement in apoptosis and mitochondrial damage in Caco-2 cells induced by enniatins A, A(1), B and B(1). *Toxicology Letters*, 222, 36-44.
- [52] Jestoi, M., Somma, M.C., Kouva, M., Veijalainen, P., Rizzo, A., Ritieni, A., Peltonen, K., 2004. Levels of mycotoxins and sample cytotoxicity of selected organic and conventional grain-based products purchased from Finnish and Italian markets. *Molecular Nutrition & Food Research*, 48, 299-307.
- [53] Bourais, I., Amine, A. 2006. Aflatoxines: Toxiques redoutables dans nos aliments. *Les technologies de laboratoire*, 4-8.
- [54] Ware, L.Y., Durand, N., Nikiema, P.A., Alter, P., Fontana, A., Montet, D., Barro, N. 2017. Occurrence of mycotoxins in commercial infant formulas locally produced in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Control*, 73, 518-523.