

İNSAN KAN LENFOSİTLERİNDE SİTRİNİNİN MITOTİK İNDEKS ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI*

Investigation of Effect of the Citrinin on Mitotic Index in the Human Blood Lymphocytes

Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ¹, Gülcan DUMLUPINAR COŞGUN²,
Nalan İMAMOĞLU³, Zuhale HAMURCU³, Bilal Cem LİMAN⁴, Halil DEMİRTAŞ¹

Özet : Mikotoksinler, insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara ve ölüme sebep olabilen mikrofunguslar tarafından oluşturulan ikincil metabolitlerdir.

Bu çalışmada, insan periferik kan lenfositlerinde mikotoksin sitrininin (CTN) mitotik indeks (MI) üzerine etkileri araştırılmıştır. Altı sağlıklı sigara içmeyen bireyden (3 erkek ve 3 kadın) heparinize periferik kan örnekleri alınmış ve Nutrient Mixture F-10 kültür ortamında 72 saat süre ile her bir kişi için 9 ayrı tüpte kültüre edilmiştir. Kültür işleminin son 48 saati boyunca, lenfosit kültürleri 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM konsantrasyonlarda CTN, 0.1 mM konsantrasyonda mitomisin c (pozitif kontrol) ve % 0.5 absolu etanol ile muamele edilmiştir. Metafaz elde etmek için, kültürlere 70. saatte 0.1 µg/ml son konsantrasyonda kolsişin eklenmiş ve 72. saatte kültür işlemi sonlandırılmıştır. 60 mM, 80 mM ve 100 mM CTN konsantrasyonlarındaki MI değerlerinin, negatif kontrollerin MI değerlerine göre önemli bir şekilde azaldığı bulunmuştur (p=0.001). Ayrıca, CTN konsantrasyonuna bağlı olarak da insan lenfositlerindeki MI oranlarında önemli bir azalmaya sebep olmuştur.

Bu sonuçlar, kültüre edilmiş insan lenfositlerinde yüksek konsantrasyonlardaki CTN'in sitotoksik olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Sitrinin, lenfosit, mitotik indeks

Summary : Mycotoxins are secondary metabolites produced by microfungi that are capable of causing disease and death in humans and other animals.

In the present study, the mycotoxin citrinin (CTN) was evaluated for their effects on mitotic index (MI) rates of human peripheral blood lymphocytes. Heparinized peripheral blood samples were obtained from six healthy non-smoking individuals (3 females and 3 males) and cultured for 72 h in the culture medium Nutrient Mixture F-10 in 9 different tubes for each individual. Lymphocyte cultures were treated for the last 48 h with CTN at the following concentrations, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM, and 0.1 mM mitomycin c (positive control) and 0.5% absolute ethanol. To block metaphases, at 70 h of incubation, colchicine was added to cultures to give a final concentration of 0.1 µg/ml, and cultures were harvested cells at 72 h.

At 60 mM, 80 mM and 100 mM CTN concentrations, significantly reduced MI values in comparison with negative controls were found (p=0.001). In addition, CTN caused a significant concentration-dependent decrease in MI rates in human lymphocytes. These results make thinking that CTN at the high concentrations is cytotoxic in cultured human lymphocytes.

Key words: Citrinin, lymphocytes, mitotic index

¹ Prof.Dr.Erciyes Ün.Tıp.Fak.Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

² Bilim Uz.Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biyoloji AD, Kayseri

³ Bilim Doktoru. Erciyes Ün.Sağ.Bil.Ens.Tıbbi Biy. AD, Kayseri

⁴ Prof.Dr.Erciyes Ün.Vet.Fak.Farm-Tok. AD, Kayseri

Mikotoksin çeşitli mantar türleri tarafından oluşturulur. Ayrıca yapısal olarak farklı ikincil metabolitleri üretirler. Bu toksik bileşikler besinlere ve ekinlere bulaşabilir. Bulaşan bu materyaller insan ve hayvanlarda patojenik olabilir ve ciddi sağlık problemlerine örneğin karaciğer, böbrek ve sinir

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY.04.33 nolu proje ile desteklenmiştir.

sisteminde hasara, ve karsinogeneze öncülük yapabilir (1, 2).

Sitrinin (CTN) mikotoksini toksik ikincil bir metabolittir (Şekil 1), ilk kez *Penicillium citrinum*'dan izole edilmiştir (3). Ayrıca *Penicillium*'um diğer türleri (*P. lividus*, *P. implicatum*, *P. citreo-viride*, *P. jenseni*, *P. notatum*, *P. expansum*) (4), *Aspergillus* (*A. terreum*, *A. candidus*, *A. nives*, *A. carneus*) (5) ve *Monascus* (6-8) tarafından da üretilmektedir. Bu mantarların

antibakteriyel etkilerinden dolayı CTN antibiyotik olarak araştırılmış (9), ancak toksisite çalışmaları bu ikincil metabolitin hayvanlarda nefrotoksik (10) etkilerinin olduğunu, böbreğin proksimal tübüllerine zarar verdiğini (11) ve insanlarda Balkan endemik nefropatisinde etken ajan olduğunu göstermiştir (12, 13). CTN'in bulaşması farklı coğrafik lokalizasyonlarda biyolojik sınırlara olduğu kadar tarım ürünlerine, yiyeceklere bulaştığı da rapor edilmiştir (14-18).

Şekil 1. Sitrinin (C₁₃H₁₄O₅) yapısı

Mikotoksinlerden biri olarak CTN antibiyotik, bakteriyostatik, antifungal ve antiprotozoal özelliklere sahiptir. Çeşitli türleri hepato-nefrotoksin olarak bilinmesine karşın (19, 20), in vitro çalışmalar CTN'in renal mitokondriyal fonksiyon ve makromolekül biyosentezi üzerinde pek çok etkiye neden olduğunu göstermiştir (21-23). Buna ek olarak CTN, et, meyve, tahıl (24) ve peynir (25) gibi besinlerde diğer nefrotoksin-ochratoksin A ile birlikte oluşur ve sinerjistik etki yapar (26, 27).

Önemli mikotoksinler arasında yer alan CTN'in sitotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar az sayıdadır. Çalışmamızda, CTN değişik dozlarda insan lenfosit kültürlerine in vitro şartlarda eklenecek ve mitotik indeks (MI) oranları değerlendirilerek, CTN'in insan kan lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için, 25-30 yaşları arasında her iki cinsiyetten üçer kişi olmak üzere toplam altı sağlıklı kişiden heparinize periferik kan örnekleri alınmıştır. Çalışmaya katılan kişiler, sigara ve alkol kullanmayan, az miktarda (günde 1-3 fincan) çay içen, kahve içme alışkanlığı olmayan, son üç ayda herhangi bir ilaç kullanmamış olan, kalıtsal bir hastalığı olmayan ve ailesinde kanser öyküsü olmayan sağlıklı kişilerden seçilmiştir.

Her bir kişi için, ~0.4 ml heparinize kan örneği, Nutrient Mixture F-10 (Biol. Ind.), fetal kalf serum (% 25; Biol. Ind.), fitohemaglutinin (% 1.5; Biol. Ind.), 100 U/ml penisilin (Biol. Ind.) ve 100 µg/ml streptomisin (Biol. Ind.) içeren 9 ayrı kültür tüpüne steril ortamda eklendi ve 37°C de 72 saat kültüre edildi. Bu tüplerin altısı CTN'in farklı konsan-

trasyonları, biri pozitif kontrol, biri etanol kontrol ve biri de negatif kontrol grubu olarak kullanıldı. Etanol kontrol grubu % 0.5 absolu etanol içermekte ve negatif kontrol grubu ise CTN ya da etanol içermemektedir.

10 mg CTN (Sigma) 2 ml etanol ile çözülerek stok solusyonu hazırlandı. Stok solusyondan 0.2 ml alınıp üzerine 0.8 ml etanol eklenerek 1 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan bu solusyonlar -20°C de saklandı. Sulandırılarak hazırlanan CTN solusyonundan 10 μM , 20 μM , 40 μM konsantrasyonlarda CTN içeren kültür tüplerini oluşturmak üzere tüplere ayrı ayrı ve sırası ile 12.5 μl , 25 μl , 50 μl eklendi. 60 μM , 80 μM , 100 μM konsantrasyonlarda CTN içeren kültür tüplerini oluşturmak üzere Stok CTN solusyonundan tüplere ayrı ayrı ve sırası ile 15 μl , 20 μl , 25 μl eklendi.

Pozitif kontrol olarak mitomisin C (MMC; Sigma) kullanıldı. 2 mg MMC 10 ml steril distile su ile çözülerek stok solusyonu hazırlandı. Stok solusyondan 0.1 ml alınarak üzerine 0.9 ml steril distile su eklendi. Hazırlanan bu solusyon -20°C de saklandı ve hazırlanan bu solusyondan pozitif kontrol kültür tüplerine son konsantrasyonu 0.1 μM olacak şekilde 8.36 μl MMC eklendi.

Lenfosit kültürleri 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM konsantrasyonlarda CTN, 0.1 mM konsantrasyonda MMC ve % 0.5 absolu etanol ile kültür işleminin son 48 saati boyunca muamele edildi. Mitoz elde etmek için, tüm kültür tüplerine 10 $\mu\text{g/ml}$ 'lik kolsişin (Biol. Ind.) solusyonundan 70. saate son konsantrasyonu 0.1 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde 0.05 ml eklendi ve 72. saate kültür işlemi sonlandırıldı.

Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamalar ayrı ayrı kodlandı. Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan %5'lik giemsada 6 dakika bekletilerek boyandı. Ayrıca her bir kişinin her bir CTN konsantrasyonu (10-100 μM arası), negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol (çözücü) kontrol için 2 kültür tüpüne ekim yapıldı ve her iki kültür tüpünden hazırlanan preparatlar değerlendirildi. Işık mikroskopunda 400X büyütmede, altı sağlıklı kişi-

nin lenfosit kültürlerinden her bir CTN konsantrasyonu, negatif kontrol, pozitif kontrol ve etanol kontrol için hazırlanan preparatlarda 3000 aktive (stimule) olmuş lenfosit sayıldı ve mitozlar kaydedildi.

Altı sağlıklı kişinin lenfosit kültürlerinde CTN'in uygulanan farklı konsantrasyonlarında bulunan MI değerleri non-parametrik testlerden Friedman testi (Çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi) ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Negatif kontrol, pozitif kontrol, etanol kontrol ve farklı CTN konsantrasyonlarındaki MI değerlerinin birbiri ile olan ilişkisini belirlemek için Sperm rho korelasyon analizi kullanıldı.

BULGULAR

Altı kişinin lenfositlerinde 6 farklı CTN konsantrasyonu, negatif kontrol, pozitif kontrol ve etanol kontrollerdeki mitoz ve hücre sayıları (Mitoz sayısı/hücre sayısı) Tablo I'de verilmiştir. Altı kişinin lenfositlerinde farklı CTN konsantrasyonları, negatif kontrol, pozitif kontrol ve etanol kontrollerdeki MI değerleri yüzde olarak Tablo II'de verilmiştir. Ortalama $\pm\text{SS}$ değerleri: negatif kontrolde 6.72 ± 1.45 , etanol kontrolde 5.81 ± 1.40 , pozitif kontrolde 3.53 ± 0.32 , 10 μM CTN'de 5.39 ± 1.57 , 20 μM CTN'de 4.51 ± 0.99 , 40 μM CTN'de 3.77 ± 0.76 , 60 μM CTN'de 3.61 ± 0.75 , 80 μM CTN'de 3.44 ± 0.67 , ve 100 μM CTN'de 3.19 ± 0.47 olarak bulunmuştur. Negatif kontrol, etanol kontrol, pozitif kontrol ve 6 farklı (10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM , ve 100 μM) CTN konsantrasyonundaki MI değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında (Tukey test), negatif kontrol MI değerleri ile pozitif kontrol ve 60 μM , 80 μM , 100 μM CTN konsantrasyonlarındaki MI değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0.001$). Etanol kontrol MI değerleri ile 100 μM CTN konsantrasyonundaki MI değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0.001$), ve etanol kontrol MI değerleri ile pozitif kontrol ve 10 μM , 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM CTN konsantrasyonlarındaki MI değerleri arasındaki farkın ise istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur ($p>0.05$).

Tablo I. Altı sağlıklı kişinin lenfosit kültürlerinde negatif kontrol, etanol kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve farklı sitrinin konsantrasyonlarındaki mitoz ve hücre sayıları (Mitoz sayısı/hücre sayısı olarak gösterilmiştir).

Denek (n)	Negatif kontrol	Etanol kontrol	Pozitif kontrol	10 mM sitrinin	20 mM sitrinin	40 mM sitrinin	60 mM sitrinin	80 mM sitrinin	100 mM sitrinin
1	224/3165	195/3028	109/3101	203/3389	141/3182	120/3090	115/3126	106/3002	100/3101
2	142/3148	125/3057	118/3432	133/3056	135/3141	116/3171	103/3092	104/3272	92/3134
3	173/3189	134/3097	118/3152	110/3121	91/3120	92/3205	90/3292	88/3327	80/3049
4	230/3177	190/3250	106/3421	144/3239	136/3200	108/3169	103/3121	105/3330	95/3088
5	252/3017	238/3058	133/3317	224/3006	174/3025	159/3083	151/3035	141/3025	121/3000
6	231/3004	201/3148	102/3056	167/3017	175/3235	113/3103	109/3018	107/3077	99/3071

Tablo II. Altı sağlıklı kişinin lenfosit kültürlerinde negatif kontrol, etanol kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve farklı CTN konsantrasyonlarındaki mitotik indeks değerleri (değerler % olarak verilmiştir).

Denek (n)	Negatif kontrol	Etanol kontrol	Pozitif kontrol	10 mM sitrinin	20 mM sitrinin	40 mM sitrinin	60 mM sitrinin	80 mM sitrinin	100 mM sitrinin
1	7.08	6.44	3.52	6.99	4.43	3.88	3.68	3.53	3.23
2	4.51	4.09	3.44	4.35	4.30	3.66	3.33	3.18	2.94
3	5.43	4.33	3.74	3.53	2.92	2.87	2.73	2.65	2.62
4	7.24	5.85	3.10	4.45	4.25	3.41	3.30	3.15	3.08
5	8.35	7.78	4.01	7.45	5.75	5.16	4.98	4.66	4.03
6	7.69	6.39	3.34	5.54	5.41	3.64	3.61	3.48	3.22
Ortalama	6.72±1.45	5.81±1.40	3.53±0.32	5.39±1.57	4.51±0.99	3.77±0.76	3.61±0.75	3.44±0.67	3.19±0.47
Ortanca (min-max)	7.16 (4.51-8.35)	6.12 (4.09-7.78)	3.48 (3.10-4.01) ^a	4.99 (3.53-7.45)	4.37 (2.92-5.75)	3.65 (2.87-5.16)	3.47 (2.73-4.98) ^a	3.33 (2.65-4.66) ^a	3.15 (2.62-4.03) ^{a, b}

SS: Standart sapma

^a p=0.001; Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında.

^b p=0.001; Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında.

Altı kişinin lenfosit kültürlerindeki negatif kontrol, pozitif kontrol, etanol kontrol ve farklı CTN konsantrasyonlarındaki MI değerlerinin birbiri ile olan ilişkisi Sperman rho korelasyon analizi ile değeri-

lendirildiğinde, farklı CTN konsantrasyonlarındaki MI değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Tablo III).

Tablo III. Altı sağlıklı kişinin lenfosit kültürlerindeki negatif kontrol, pozitif kontrol, etanol kontrol ve farklı CTN konsantrasyonlarındaki MI değerlerinin birbiri ile olan korelasyon matrisinin dağılımı

	Negatif kontrol	Etanol kontrol	Pozitif kontrol	10 mM sitrinin	20 mM sitrinin	40 mM sitrinin	60 mM sitrinin	80 mM sitrinin	100 mM sitrinin
Negatif kontrol	1								
Etanol kontrol	r=0.829 p=0.042	1							
Pozitif kontrol	r=0.086 p=0.872	r=0.371 p=0.468	1						
10 mM sitrinin	r=0.771 p=0.072	r=0.943 p<0.01	r=0.257 p=0.623	1					
20 mM sitrinin	r=0.714 p=0.111	r=0.771 p=0.072	r=0.257 p=0.623	r=0.886 p=0.019	1				
40 mM sitrinin	r=0.371 p=0.468	r=0.657 p=0.156	r=0.429 p=0.397	r=0.829 p=0.042	r=0.829 p=0.042	1			
60 mM sitrinin	r=0.600 p=0.208	r=0.829 p=0.042	r=0.371 p=0.468	r=0.943 p<0.01	r=0.943 p<0.01	r=0.943 p<0.01	1		
80 mM sitrinin	r=0.600 p=0.208	r=0.829 p=0.042	r=0.371 p=0.468	r=0.943 p<0.01	r=0.943 p<0.01	r=0.943 p<0.01	r=0.999 p<0.01	1	
100 mM sitrinin	r=0.771 p=0.072	r=0.943 p<0.01	r=0.257 p=0.623	r=0.999 p<0.01	r=0.886 p=0.019	r=0.829 p=0.042	r=0.943 p<0.01	r=0.943 p<0.01	1

TARTIŞMA

Kiso ve arkadaşları (28) çalışmalarında CTN ve patulin mikotoksinlerinin mikrotubul (mitoz sırasında kromatidlerin ayrılmasında fonksiyon gören ökaryotik sitoiskelet yapısı) kaybı üzerine etkilerini araştırmışlar ve CTN'in 25-100 µg/Disk konsantrasyonlarında *Aspergillus nidulans benA33* mutantlarında mikrotubul asemblesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Benzer şekilde, CTN'in Chinese hamster V79 hücrelerinde de konsantrasyona bağlı olarak mikrotubul polimerizasyonunu inhibe ettiği ve mitotik hücre sayılarının arttığı gösterilmiştir (29). Bu bulgulara zıt olarak bizim sonuçlarımızda, kültüre edilmiş insan lenfositlerinde negatif kontrol

MI değerleri ile pozitif kontrol ve 60-100 µM arası yüksek CTN konsantrasyonlarındaki MI değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuş (Tablo II), ve CTN konsantrasyonları arttıkça konsantrasyona bağlı olarak metafaz sayılarının azaldığı ve dolayısıyla MI oranlarının azaldığı gösterilmiştir (Tablo III).

Ancak, bizim sonuçlarımızla tutarlı olarak, soğan (*Allium cepa*) kök hücrelerinde CTN'in farklı konsantrasyonlarında MI oranlarının araştırıldığı başka bir çalışmada, CTN konsantrasyonlarının artışı ile MI oranlarında önemli azalmalar olduğu gözlenmiştir (30). Ayrıca, kültüre edilmiş hepatom hücrelerinde CTN'in 50 ve 200 µM arası konsantrasyon-

larında sitotoksik olduğu (31), Chinese hamster V79 hücrelerinde >40 µM CTN konsantrasyonlarında ölü hücre oranlarının arttığı (29) ve insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) 60 µM konsantrasyonda hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu (32) gösterilmiştir.

İnsan lenfosit kültürlerinin kullanıldığı çalışmamızda, mikrotubul polimerizasyonunu inhibe edici etkisinden dolayı uyguladığımız CTN konsantrasyonlarında mitoz sayılarının artması beklenirken, MI değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak azaldığını gösteren sonuçlar bulmamız şaşırtıcı olabilir. Bununla birlikte, yukarıda tartışılan çalışmalarda kullanılan hücrelerin, sitotoksisite yöntemlerinin, uygulanan CTN konsantrasyonları ve CTN uygulama sürelerinin farklı olması, birbirine ters düşen sonuçları ortaya çıkarabilir. Sonuç olarak, insan kan lenfositlerinde in vitro olarak yüksek CTN konsantrasyonlarında mitotik indeksin azaldığını gösteren sonuçlarımızın CTN'in sitotoksik etkisini desteklediğini düşünmekteyiz. Bu nedenle, CTN ile kontamine olmuş yiyeceklerin tüketilmesinin insan sağlığını tehdit edici olduğu unutulmamalı, dikkatli olunmalı ve gerekli önlemler alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Kaya S. Mikotoksinler. Kaya S, Piriñçi I, Bilgili A (Eds). Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Medisan, Ankara 2002, ss 537-542
2. Bennett JW, Klinc M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev 2003, 16(3): 497-516.
3. Hetherington AC, Raistrick H. Studies in biochemistry of microorganism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow coloring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. Phil Trans R Soc London 1931, 220: 269-297.
4. Ei-Banna AA, Pitt JI, Leistner L. Production of mycotoxins by *penicillium* species. Syst Appl Microbiol 1987, 10: 42-46.
5. Kurata H. Mycotoxins and mycotoxicoses. In A.E. Pohland, V.R. Dowell, J.L. Richards (Eds), Microbial toxins in foods and feeds. Plenum Press. New York, USA: 1990, pp 249-259.
6. Blanc PJ, Loret MO, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnol Lett 1995, 17(3): 291.
7. Blanc, PJ, Laussac JP, Le JB, et al. Characterisation of monascidin A from *Monascus* as citrinin. Int J Food Microbiol 1995, 27: 201-213.
8. Li F, Xu G, Li Y. Study on the production of citrinin by *Monascus* strains used in food industry. Wei Sheng Yan Jiu 2003, 32(6): 602-605.
9. Wong HC, Koehler PE. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. J Food Sci 1981, 46: 589-592.
10. Betina V. In Betina, V. (Ed.), Mycotoxins-Production, Isolation, Separation and Purification (Developments in Food Science, Vol. 8) Elsevier, Amsterdam, the Netherland. 1984, pp 217-236.
11. Phillips RD, Hayes AW, Berndt WO, Williams W. Effects of citrinin on renal function and structure. Toxicology 1980, 16: 123-127.
12. Frank HK. Citrinin. Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft, 1992 31: 164-177.
13. IARC. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. In Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, (Vol. 40). IARC, Lyon, France. 1986, pp 83-98.
14. Bailly JD, Querin A, Le Bars-Bailly S, Bernard G, Guerre P. Citrinin production and stability in cheese. J Food Protect, 2002, 65 (8): 1317-1321.

15. CAST. Mycotoxin: risks in plant, animal, and human systems. Council of Agricultural Science and Technology, Task force rep. No.139, CAST, Ames, IA. 2003.
16. Comerio R, Fernandez Pinto VE, Vaamonde G. Influence of water activity on penicillium citrinum growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. *Int J Food Microbiol* 1998, 42: 219-223.
17. Gimeno A, Martins ML. Rapid thin layer chromatographic determination of patulin, citrinin and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. *J Assoc Offical Analytic Chem* 1983, 66(1): 85-91.
18. Kpodo K, Sorensen AK, Jakobsen M. The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. *Food Chem* 1995, 56(2): 147-153.
19. Berndt WO. Ochratoxin-citrinin as nephrotoxins. In GC Llewellyn & PC O'Rear (Eds.), *Biodeterioration Research 3*. Plenum Press. New York, USA: 1990, pp 55-56.
20. Bilgrami KS, Sinha SP, Jeswal P. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of citrinin in mice (*Mus musculus*). *Proceed Indian National Sci Acad*, 1988, B54: 35-37.
21. Chagas GM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effect on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *J Appl Toxicol* 1992, 12: 123-129.
22. Chagas GM, Oliveira MBM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of liver mitochondria. *Cell Biochem Funct* 1992, 10: 209-216.
23. Chagas GM, Oliveria MBM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondria swelling. *J Appl Toxicol* 1995, 15: 91-95.
24. Lepom P. Simultaneous determination of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A in wheat and barley by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986, 355(1): 335-339.
25. Vazquez BII, Fente C, Franco C, Cepeda A, Prognon P, Mahuzier G. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium. *J Chromatogr A* 1996, 727: 185-193.
26. Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Martlbauer E. Cooccurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J Agr Food Chem* 2000, 48: 2383-2488.
27. Glahn RP, Shapiro RS, Vena VE, Wideman RF, Huff WE. Effects of chronic ochratoxin A and citrinin toxins on kidney function of single comp white leghorn pullets. *Poultry Sci* 1989, 68(9): 1205-1211.
28. Kiso T, Fujita K, Ping X, Tanaka T, Taniguchi M. Screening for microtubule-disrupting antifungal agents by using a mitotic-arrest mutant of *Aspergillus nidulans* and novel action of phenylalanine derivatives accompanying tubulin loss. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48(5): 1739-1748.
29. Pfeiffer E, Gross K, Metzler M. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis* 1998, 19: 1313-1318.

30. *Sinha RK, Dubey A, Sinha KK. Cytotoxic effect of citrinin on relative division rate of Allium-cepae root-cells. Lett Appl Microbiol 1992, 14 (3): 118-120.*
31. *Lorkowski G, Creppy EE, Beck G, Dirheimer G, Röschenthaler R. Inhibitory action of citrinin on cultured hepatoma cells. Food Cosmetic Toxicol 1980, 18: 489-491.*
32. *Liu BH, Wu TS, Su MC, Chung CP, Yu FY. Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in Monascus fermentation products. J Agric Food Chem 2005, 53(1): 170-175.*