Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara, 46(2): 393-404, 2022
Doi: 10.33483/jfpau.1078080

ÖZGÜN MAKALE / ORIGINAL ARTICLE

PATULİNİN KARACİĞER VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO* ANTİTÜMÖR AKTİVİTESİ

IN VITRO ANTITUMOR ACTIVITY OF PATULIN ON LİVER AND LUNG CANCER CELL LINES

Hande YÜCE[1], Neşe Başak TÜRKMEN[1], Selinay ŞENKAL[2], Dilan Aşkın ÖZEK[3], Ezgi BULUT[2], Ayşegül DOĞAN[2], Songül ÜNÜVAR[1*]

[1]İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı, 44000, Malatya, Türkiye

[2]Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendisliği, 34755, İstanbul, Türkiye

[3]Fırat Üniversitesi, Kovancılar Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, 23000, Elazığ, Türkiye

ÖZ

Amaç: *Patulin, başta Aspergillus ve Penicilium olmak üzere bazı küf mantarları tarafından üretilen bir mikotoksin olup, hayvanlarda ve insanlarda mikotoksikozdan sorumludur. Patulinin antitümör aktivitesi hakkında hala çok ayrıntılı veriler bulunmamakla birlikte bazı raporlar hücresel apoptozu ve toksisiteyi indüklediğini göstermektedir. Bizim bu çalışmadaki amacımız patulinin insan karaciğer ve akciğer kanseri hücreleri üzerindeki antiproliferatif, antimigrasyon etkilerini ve apoptotik yolaklardaki gen ifadeleri üzerine etkisini belirlemektir.*

Gereç ve Yöntem: *Patulinin karaciğer ve akciğer kanserleri tedavisindeki etkinliğini belirlemek için HEP3B ve A549 hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları, artan konsantrasyonlarda patuline (1, 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM) maruz bırakıldı, ardından MTS testi, yara iyileşme testi ve RT-PCR deneyleri ile, hücre canlılığı, hücre göçü ve apoptoz belirlendi.*

Sonuç ve Tartışma: *Patulin her iki kanser hücre hattında da doza bağlı olarak hücre canlılığında ve hücre göçünde önemli bir azalmaya neden oldu Ayrıca her iki hücre hattında da apoptozun indüksiyonunu teşvik etti. Sonuçlarımız patulinin insan karaciğer ve akciğer kanser hücrelerinde tümör büyümesini in vitro olarak önemli ölçüde azaltabileceğini gösterdi.*

Anahtar Kelimeler: *A549, apoptoz, HEP3B, kanser, mikotoksin, patulin.*

ABSTRACT

[*] **Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Songül Ünüvar
e-posta / e-mail: songul.unuvar@inonu.edu.tr, **Tel. / Phone:** +90 506 245 40 54

Gönderilme / Submitted: 23.02.2022 **Kabul / Accepted:** 19.04.2022

Objective: *Patulin is a mycotoxin produced by some molds, mainly Aspergillus and Penicillium, and is responsible for mycotoxicosis in animals and humans. Although there are still no detailed data on the antitumor activity of patulin, some reports indicate that it induces cellular apoptosis and toxicity. Our aim in this study is to determine the antiproliferative and antimigration effects of patulin on human liver and lung cancer cells and its effect on gene expressions in apoptotic pathways.*

Material and Method: *HEP3B and A549 cell lines were used to determine the efficacy of patulin in the treatment of liver and lung cancers. Cell lines were exposed to increasing concentrations of patulin (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, and 100 μM), followed by determination of cell viability, cell migration, and apoptosis by MTS assay, wound healing assay, and RT-PCR assays.*

Result and Discussion: *Patulin caused a dose-dependent significant decrease in cell viability and cell migration in both cancer cell lines. It also promoted the induction of apoptosis in both cell lines. Our results showed that patulin can significantly reduce tumor growth in human liver and lung cancer cells in vitro.*

Keywords: *A549, apoptosis, cancer, HEP3B, mycotoxin, patulin*

GİRİŞ

Patulin (4-hydroxy-4H-furo-3,2-C-pyran-2(6H)-one), çeşitli küf mantarları, özellikle *Aspergillus, Penicillium* ve *Byssochlamys* tarafından üretilen toksik bir ikincil metabolittir [1]. Elma, elma suyu, elma şarabı, kompostolar ve küçük çocuklara yönelik elma püreleri gibi elma türevli ürünlerde en yaygın bulunan mikotoksindir. İnsanların patuline maruziyeti sonucu gözlenen immünolojik, nörolojik ve gastrointestinal hastalıklar nedeniyle birçok ülkede gıdalardaki kontaminasyon limitlerinin yasal düzenlemelerle belirlenmesine ihtiyaç duyulmuştur [2]. İnsanların yanı sıra patuline maruz kalmanın hayvanlarda ve bazı mikroorganizmalarda sülfidril gruplarına olan afinitesi nedeniyle immünotoksisite, genotoksisite, embriyotoksisite ve teratojeniteye neden olduğu gösterilmiştir [3]. Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC, International Agency forResearch on Cancer) tarafından Grup III karsinojen olarak sınıflandırılmıştır [4]. Deney hayvanlarında toksisiteye neden olduğuna dair çalışmaların olmasının yanısıra, patulinin antikanser aktivitesi üzerine çalışmalar da mevcuttur [5]. Patulinin antikanser aktivitesini hangi mekanizmalar üzerinden, hangi dozlarda gerçekleştirdiği ve etkili olduğu kanser türleri net olarak bilinmemektedir. Ancak yapılan çalışmalarda reaktif oksijen radikalleri (ROS) ile ilgili mekanizmalarla hücresel apoptozu ve sitotoksisiteyi indüklediği öne sürülmüştür [6]. Patulin, elektrofilik özelliği nedeniyle RNA, glutatyon (GSH) ve proteinlerin sülfidril gruplarına kovalent bağlanmaktadır. Bunun sonucunda da GSH tüketimine, RNA ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır [7]. Bunların yanı sıra mitokondriyal apoptotik sinyal yolaklarını aktive ederek de sitotoksisiteye neden olmaktadır [8].

Kanser tedavisinde kullanılan güncel ilaçların nötropeni, immünsupresyon, infertilite, periferik nöropati, kalp, böbrek ve karaciğer hasarı gibi ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, araştırmacılar doğada bulunan bakteri veya mantar toksinlerinin kanser tedavisindeki etkinliğini araştırmaya odaklanmışlardır [5].

Patulinin insan hücre hatları, özellikle kanser hücreleri üzerindeki etkilerine dair çok az veri bulunmaktadır. Bu çalışmada, patulinin insan karaciğer ve akciğer kanseri hücreleri üzerindeki

antiproliferatif, antimigrasyon etkilerini ve apoptotik yolaklardaki gen ifadeleri üzerine etkisini belirlemeyi amaçladık. Çalışmamız, A549 ve HEP3B hücrelerinde farklı dozlarda patulin uygulamasından sonra apoptotik genlerin ilk defa analiz edilmesi bakımından bu alanda yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

İnsan karaciğer kanseri hücreleri (HEP3B), akciğer kanseri hücreleri (A549) ve sağlıklı fibroblast hücreleri (L929) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu′ndan (ATCC) temin edildi. HEP3B ve A549 hücreleri 25 cm^2′lik flasklarda, %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Chemical Co.) kullanılarak, 37°C, %5 kısmi CO_2 basıncı ve nemli ortam içeren inkübatör içerisinde yetiştirildi. Hücreler, %0.25 tripsin-EDTA ile (TrypLE™ Express, Invitrogen, Carlsbad, CA) haftada 2-3 kez pasajlandı ve fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen hücreler DMEM içinde istenen konsantrasyona yeniden süspanse edildi. Patulinin (Toronto Research Chemicals, Cas No: 149-29-1) stok solüsyonları dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanarak, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlara seyreltildi.

Sitotoksisite Deneyi

Hücrelerin yaşaması ve proliferasyonu, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) testi ile kantitatif ve kolorimetrik olarak belirlendi. MTS testinin yapılması için HEP3B, A549 ve L929 hücreleri 96 kuyucuklu plakalar içerisine 24 saat önceden 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 100 µL besi ortamı içerisine ekildi. 24 saat sonra patulin 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlarda 96 kuyucuklu plakalar içerisinde yer alan hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saat boyunca 37°C, %5 kısmi CO_2 basıncı ve nemli ortam içeren inkübatör içerisinde inkübe edildi. Ardından her bir kuyucuğa 10 µL MTS solüsyonu ilave edildi. Plaklar MTS solüsyonu ilavesini takiben 3 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besi ortamı uzaklaştırılarak kuyucuklara 100 µL %20′lik DMSO ilave edildi ve 20 dakika daha inkübasyona bırakıldı. Ardından Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) mikroplak okuyucu ile (BioTek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, ABD) 450 nm'de absorbanslar ölçülerek değerlendirildi. Patulinin her bir konsantrasyonu 4 tekrarlı çalışıldı. Elde edilen veriler aşağıda belirtilen formül kullanılarak her bir grup için hücre canlığının %50 inhibe olduğu dozlar (IC50) patulin uygulanmış olan hücrelerde belirlendi.

% Hücre canlılık oranı =$(A_{test}-A_{kör}/A_{kontrol}-A_{kör})$ x100 [9].

Wound Healing (Yara İyileşme) Testi

12 kuyucuklu plaklara 1 ml içinde 10^3 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 24 saat standart inkübasyondan (%5 CO_2, 37°C) sonra, 200µl'lik pipet ucu ile kuyucuğun ortasından saat 12 yönünden başlayarak saat 6 yönüne düz bir çizgi çizildi. Sonrasında kuyucuklardaki vasat çekilip taze medyum ile birkaç kez yıkama yapıldı. Daha sonra hücreler 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM konsantrasyonlarda patulin ile muamele edildi. Yara iyileşme oranı 0, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlardan sonra ters ışık mikroskobu (SOPTOP ICX41, China) ile değerlendirildi [10].

Genlerin İfade Edilmesinin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ölçümü

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri için Bcl-2, Bax, Bcl-xl, c-myc, p53, PTEN ve MAPK primerleri Primer-BLAST yazılımı (Bethesda, MD, USA) ile dizayn edilip, Sentebiolab (Ankara, Türkiye) firması tarafından sentezlendi. β-Actin kontrol geni olarak kullanıldı. Toplam RNA Trizol solüsyonu (#T9424, Sigma, USA) kullanılarak izole edildikten sonra, iScprit cDNA sentez kiti (Bio-Rad, USA) kullanılarak izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentez edildi. Gen anlatım analizleri SYBR Green (Biorad) metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Data analizleri Biorad PCR cihazı (Biorad CFX 96) ve Biorad CFX programı kullanılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar GraphPad programı ile istatistiksel olarak analiz edilerek grafikler şeklinde hazırlandı [11].

Tablo 1. RT-PCR analizinde kullanılan primerlerin gen dizileri.

Gen	Gen Dizilimi
Bax	F 5' TTGGAGCAGCCGCCCCAGG 3' R 5' CGGCCCCAGTTGAAGTTGCC 3'
Bcl-2	F 5' AGAGCAACCCAATGCCCGC 3' R 5' CAACGAGGGGCCTGAGAGG 3'
PTEN	F 5' TCATGTGGCTGCCATTCACTGC 3' R 5' TTGCCTCGGTGTAACAAGTACGC 3'
MAPK	F 5' AGGCTGTTCCCAAATGCT 3' R 5' CGTCACTCGGGTCGTAAT 3'
P53	F 5' ACGCTTCCCTGGATTGGCAGCC 3' R 5' CCATTGCTTGGGACGGCAAGGG 3'
Bcl-xl	F 5' GAACTCTTTCGGGATGGGGTA 3' R 5' CAGAACTACACCAGCCACAGTC 3'
c-myc	F 5' CGTCTCCACACATCAGCACAA 3' R 5' TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT 3'
β- Actin	F 5' GACAGGATGCAGAAGGAGATTACT 3' R 5' TGATCCACATCTGCTGGAAGGT 3'

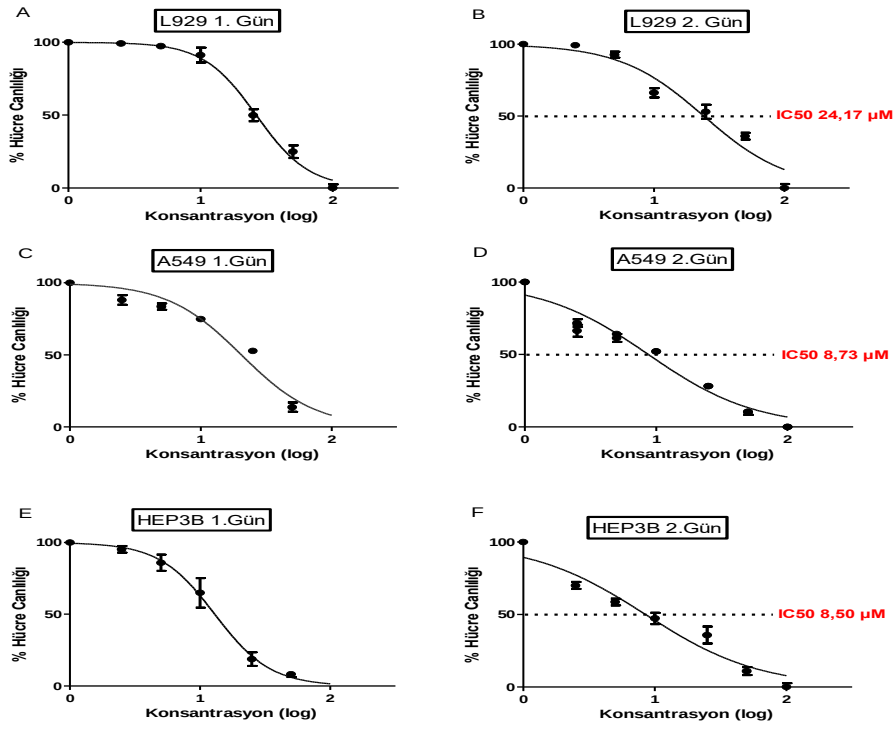
İstatistiksel Analiz

Yara iyileşmesini analiz etmek için Imagej programı kullanıldı. Hücre canlılığı ve yara iyileşmesi % olarak ifade edildi. Tanımlayıcı veriler SPSS 22.0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak analiz edildi. Yara iyileşmesindeki istatistiksel farklılıklar, iki yönlü

varyans analizi kullanılarak hesaplandı. IC_{50} değerleri ve gen analiz sonuçları GraphPad Prism 8 programı kullanılarak hesaplandı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇ VE TARTIŞMA

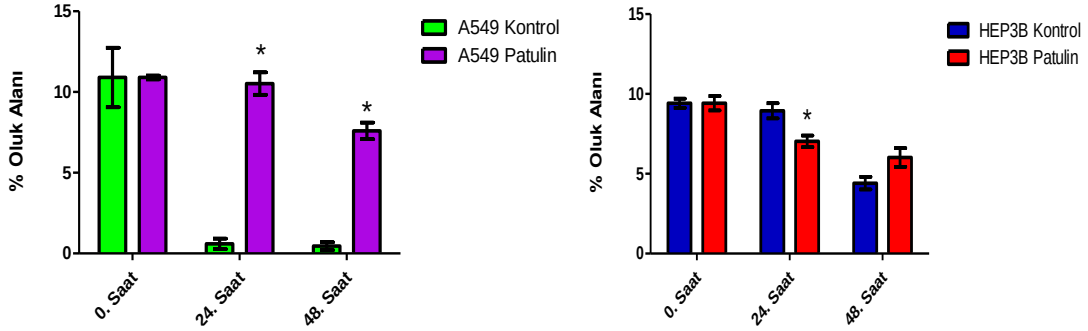
Patulinin farklı dozlarda uygulanmasından sonra HEP3B, A549 ve L929 hücreleri üzerindeki hücre canlılığı etkisi Şekil 1'de gösterildi. 24. saat verileri değerlendirildiğinde patulinin sağlıklı hücrelere (26.40 µM) kıyasla HEP3B hücreleri (12.98 µM) ve A549 hücreleri (20.47 µM) üzerinde daha düşük dozlarda hücre canlılığını inhibe ettiği bulundu. 48. saat verileri değerlendirildiğinde 24. saat verilerine benzer olarak, sağlıklı hücrelere (24.17 µM) kıyasla HEP3B hücreleri (8.50 µM) ve A549 hücreleri (8.73 µM) üzerinde daha düşük dozlarda hücre canlılığını inhibe ettiği bulundu. 24. ve 48. saatler karşılaştırıldığında patulinin, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği gözlendi. HEP3B hücreleri üzerinde hem 24. hem de 48. saatte etkili bulundu. A549 hücreleri üzerinde zamana bağlı antiproliferatif etki gözlendi. Bu bakımdan patulinin HEP3B hücrelerinde hücre canlılığını daha çok etkilediği bulundu.



Şekil 1. Patulinin sağlıklı ve kanser hücre hatlarında 24. ve 48. saatlerdeki IC_{50} değerleri.

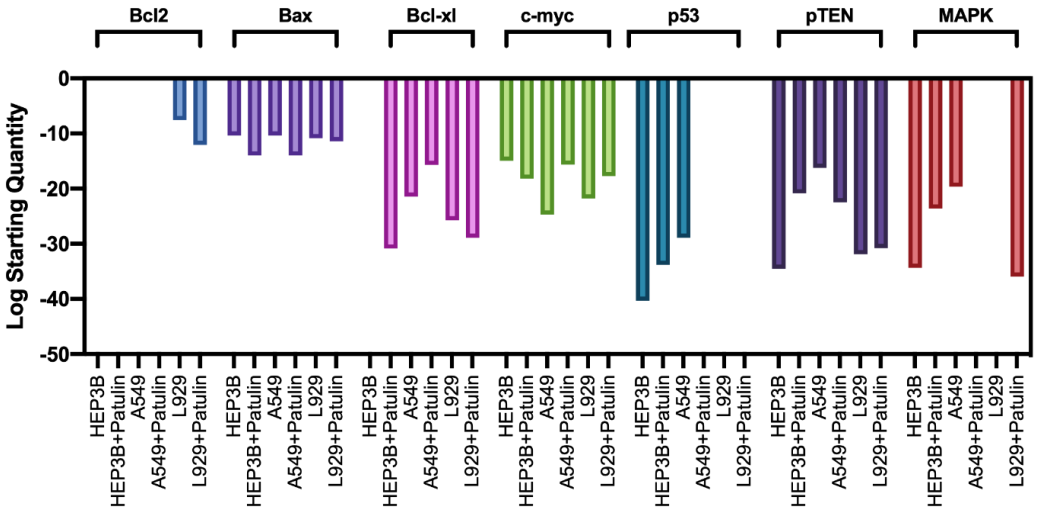
Patulinin hücre göçü üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan yara iyileşme testinin sonuçları değerlendirildiğinde; ilk 24 ve 48 saatte açılan yarıkların en düşük düzeyde iyileştiği ve hücrelerin

migrasyon yeteneğinin kısıtlandığı görüldü. Yara kapanma testi sonuçları, patulin uygulamasının yara kapanmasını önemli ölçüde hızlandıran hücresel göçü iyileştirdiğini gösterdi (Şekil 2). 24. saatte patulinin sağlıklı hücrelere kıyasla HEP3B hücreleri üzerine %21.4, A549 hücreleri üzerine %94.4 oranında hücrelerin göç kabiliyetini inhibe ettiği bulundu. 48. saatte ise hücre göçünü A549 hücreleri üzerinde %94.1 oranında inhibe etti. Ancak HEP3B hücrelerinde ise tam tersi sağlıklı hücrelere kıyasla hücre migrasyonunda %36.5 oranında artış bulundu. Patulinin antimigrasyon etkisi A549 hücreleri üzerinde daha belirgin gözlendi.



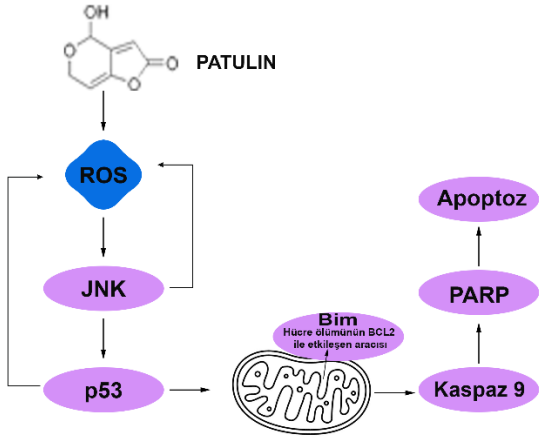
Şekil 2. Patulinin sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerindeki antimigrasyon etkisi (* $p<0.05$)

Patulinin HEP3B, A549 ve L929 hücrelerindeki apoptotik ve proliferatif gen anlatım seviyeleri değerlendirildi. HEP3B hücrelerinde, patulin uygulaması Bax ve Bcl-xl gibi apoptotik belirteçlerin gen seviyesinde artışa neden oldu. c-myc, pTEN ve MAPK gibi proliferasyon ile ilişkili gen anlatımlarında ise azalmaya neden oldu. A549 hücrelerinde, patulin uygulaması hücrelerde pro-apoptotik Bax geninin anlatımında azalmaya sebep oldu. Aynı zamanda hücre çoğalma yolağını inhibe eden pTEN geninin ifadesinde de azalmaya sebep oldu. Sağlıklı hücrelerde, anti-apoptotik belirteç Bcl-2 gen seviyesinde düşüş gözlendi. pTEN gen anlatımında ise anlamlı olmayan bir artışa neden oldu. Bunun aksine, c-myc belirteci ile hücre proliferasyonu açısından önemli derecede bir artış gözlendi.



Şekil 3. Patulinin sağlıklı ve kanser hücrelerindeki RT-PCR sonuçları.

Patulin, *Aspergillus, Penicillium* ve *Byssochlamys* başta olmak üzere çeşitli mantarlar tarafından üretilen bir mikotoksindir [12]. Elmalarda ve elma esaslı ürünlerde kirletici olarak bulunur. Kontaminant olarak gıdalarda bulunması nedeniyle gıda güvenliği ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Son çalışmalarda patulinin kanser hücre hatlarında apoptoz indüksiyonu yoluyla güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [13]. Bu çalışmada, patulinin, HEP3B ve A549 hücreleri üzerindeki proapoptotik ve antimigrasyon aktivitesini değerlendirdik. Ayrıca p53 yolağını indükleme yeteneğini inceleyerek akciğer ve karaciğer kanseri tedavisinde aday bir molekül olabilirliğine ışık tutmayı amaçladık (Şekil 4).



Şekil 4. Patulinin mitokondriyal stres yolu üzerindeki etkisi.

Son yıllarda patulin toksisitesi üzerine yapılan toksikolojik çalışmalarda bu mikotoksinin bağırsaklar, kalp ve böbrekler dahil olmak üzere birçok organı etkilediği öne sürülmüştür [2]. Patulinin memeli hücrelerinde, apoptozu aktive ettiği rapor edilmiştir. İnsan promyelositik lösemi hücrelerinde (HL-60) ROS oluşumu aracılığıyla apoptozu indüklemektedir. İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde 293 (HEK293) ise mitojenle aktive olan protein kinazlardan (MAPK) p38 kinazın ve c-Jun N-terminal kinazın (JNK) fosforilasyonu aracılığıyla apoptozu indüklemektedir [14]. Yapılan diğer çalışmalarda ise patulinin ölümsüzleştirilmiş insan keratinosit hücreleri (HaCaT) [15], insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) [14] hücreleri gibi insan hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Çin hamsteri yumurtalık hücreleri (CHO-K1) [16], Çin hamster akciğer fibroblast hücreleri (V79) [17] ve kendiliğinden ölümsüzleştirilmiş sıçan granulosa hücreleri (SIGC) [18] gibi hayvan hücrelerinde de toksisiteye neden olduğu bulunmuştur. Daha önce araştırma ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada patulinin, kolon (HCT116) ve meme (MCF-7) kanseri hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda; nöroblastom (SH-SY5Y) hücrelerinde ise hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gösterdiğini bulduk. Çalışma sonuçlarımıza dayanarak patulinin, uygun dozlarda nöroblastom, kolon ve meme kanserlerinin tedavisinde yeni bir aday molekül olabileceğini öne sürebiliriz [19]. Önceki in vivo çalışmalar, patulinin aktif dozları ile tedavi sonucu yan etkiler gözlendiğini

bildirmemiştir. Ancak yine de toksisitesinin farkında olunmalı ve dozlar buna göre uyarlanmalıdır [2,20]. Wu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, insan promyelositik lösemi hücrelerinde (HL-60) en düşük hücre canlılığını ve en büyük morfolojik değişiklikleri patulinin 2.5 μM konsantrasyonda gösterdiği gözlenmiştir [21]. Bununla birlikte, Luft ve ark′nın [22] yaptığı bir çalışmada, periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) hücre canlılığının azalmasına daha düşük konsantrasyonda (0.6 μM) neden olduğu bildirilmiştir [14]. Bizim çalışma sonuçlarımız değerlendirildiğinde (Şekil 1), patulinin hem akciğer hem de karaciğer hücrelerinde hücre canlılığını benzer dozlarda (8.73 μM ve 8.50 μM, sırasıyla) azalttığını bulduk. Sonuçlarımız patulinin hücre canlılığını azalttığını öne süren bulgular ile uyumludur. Patulinin hücre göçü (Şekil 2) ile ilgili bulgularımızda ise akciğer hücreleri üzerinde daha belirgin antimigrasyon aktivite gösterdiğini gözlemledik.

Patulinin apoptoz ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda, farklı hücre hatlarında apoptozu indüklediği kanıtlanmıştır [14]. Wu ve ark. apoptozun, sitokrom c'nin sitozole salındığı ve parçalanmış kaspaz-9 seviyesinin yükseldiği Bcl-2 ailesi tarafından intrinsik yolda patulin tarafından başlatıldığını bildirmiştir [21]. Ayrıca, p38 kinazın aktivasyonu ve c-Jun N-terminal kinaz sinyali, HEK hücrelerinde patulin tarafından indüklenen apoptotik yollar olarak tanımlanmıştır [14]. İnsan serviks kanseri (HeLa) ve kolorektal kanseri (SW-48) hücre hatlarının patuline maruz kalmasının apoptozun indüklenmesine yol açtığı bulunmuştur. Apoptozun belirlendiği BrdU testinde tüm hücre hatları üzerinde en güçlü apoptotik etkinin 4 μM patulin konsantrasyonunda elde edilmiştir. Tüm hücre hatları arasında apoptoz oranının en yüksek HeLa hücrelerinde gözlendiği tespit edilmiştir [5]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, bu mikotoksinin melanom hücrelerinde (B16F10) hücre proliferasyonu ve anti-tümör etkisi in vivo Balb/c farelerde değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, 20 gün boyunca intraperitoneal patulin uygulamasının, B16F10 hücre implante edilmiş farelerde tümör gerilemesini önemli ölçüde indüklediğini gözlemiştir. Bu etki, p53 ve Bax ifadelerindeki artış, Bcl2 protein seviyelerinin aşağı regülasyonu ve kaspaz-3 aktivitesindeki artış ile desteklenen apoptozun aktivasyonu ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, sistemik toksisite analizi, anemi, iltihaplanma ve karaciğer fonksiyon bozukluğu gözlenen melanom farelerinin aksine patulin uygulamasını takiben potansiyel bir toksisite olmadığı gözlenmiştir. Boussabbeh ve ark′nın yaptığı bu çalışma, patulinin in vivo modellerdeki terapötik etkinliğini gösteren ilk yayınlanmış rapordur [20].

p53; hücre döngüsü kontrol noktalarını, apoptozu ve DNA onarımını kontrol eden ilk tanımlanmış ve en iyi bilinen tümör baskılayıcıdır. p53'ün bu geleneksel işlevlerine ek olarak, giderek artan kanıtlar, p53'ün redoks dengesinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir [23]. Zhou ve ark′nın yaptığı çalışmada, insan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerinde patulin ile indüklenen p53 protein birikimi gözlenmiştir. Bu durumun patulin ile indüklenen p53 aktivasyonunun DNA hasarına bir down-regülasyon yanıtı olduğu öne sürülmüştür. Bu sonuçlar, patulinin, muhtemelen oksidatif stres yoluyla HepG2 hücrelerinde DNA zinciri kopmalarına neden olduğunu göstermektedir.

Bu bilgilere dayanarak araştırmacılar p53 proteininin, patulin kaynaklı DNA hasarına karşı hücresel savunmadan sorumlu bir protein olduğunu öne sürmektedirler [24]. Tümör baskılayıcı gen p53, kısmen mitokondriyal Bax ekspresyonunun yukarı regülasyonu yoluyla programlanmış hücre ölümünün aktivasyonuna aracılık eder. Bax, mitokondriyal stres yoluyla apoptoz için anahtar bir bileşendir. Bax, oligomerler oluşturur ve sitozolden mitokondriyal membrana yer değiştirir. Mitokondriyal membran üzerindeki por proteinleri ile etkileşimler yoluyla membran geçirgenliğini arttırır. Bu da mitokondriden sitokrom c'nin salınmasına ve apoptozda önemli bir efektör olan kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar [25].

Bizim çalışmamızda patulin uygulaması HEP3B hücrelerinde, Bcl-2 gen ailesi proteinleri olan Bax ve Bcl-xl gibi apoptotik belirteçlerin gen seviyesinde artışa sebep olmuştur. Bu proteinler apoptozun düzenlenmesinde belirleyici bir role sahiptir. Gen seviyelerindeki hücre ölümünü engeller ya da belirgin biçimde azaltır. Bunu genel apoptoz yolunu kapatarak yapar. Ayrıca patulin HEP3B hücrelerinde, c-myc, pTEN ve MAPK gibi proliferasyon ile ilişkili gen anlatımlarında azalmaya sebep oldu. Bunların inhibisyonu, hücrede normal apoptotik sürecin aktivasyonuna katkıda bulunabilir. A549 hücrelerinde, patulin uygulaması hücrelerde pro-apoptotik Bax geninin anlatımında azalmaya sebep oldu. Hücrenin apoptoza gidişi azalmıştır. Aynı zamanda hücre çoğalma yolağını inhibe eden pTEN geninin ifadesinde de azalmaya sebep oldu. Bu sonuçlar MTS testi sonuçları ile uyumlu bulundu. Sağlıklı hücrelerde ise, anti-apoptotik belirteç Bcl-2 gen seviyesinde düşüşe, pTEN gen anlatımında ise anlamlı olmayan bir artışa neden oldu. Bunun aksine, c-myc belirteci ile hücre proliferasyonu açısından önemli derecede bir artış gözlendi.

Mantar türleri genellikle kanser tedavisinde kullanılabilecek pekçok önemli metabolit üretirler. Çalışmamızda ve önceden yapılmış diğer çalışmalarda patulinin toksisite ve apoptoz indüksiyonu nedeniyle kanser önleyici bir aday olarak kabul edilebileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada patulinin karaciğer kanseri ve akciğer kanseri hücre hatlarında farklı konsantrasyonlardaki sitotoksik aktivitesi, hücre migrasyonu üzerindeki etkisi ve apoptoz ilişkili gen anlatım seviyelerindeki değişiklikler kontrol grubu (L929) ile karşılaştırıldı. Patulinin antitümöral aktivite gösterdiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatür incelemeleri ve çalışmamız sonucunda patulinin antitümöral ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Patulin ile akciğer kanseri hücre hatları arasındaki ilişkiyi inceleyen literatürler mevcuttur [14,26,27]. Monteillier ve ark. patulinin, Wnt yolunun inhibisyonu yoluyla insan akciğer adenokarsinom hücreleri (A549) üzerinde antiproliferatif ve antimigrasyon etkiler gösterdiğini bulmuşlardır. Bu veriler, akciğer kanseri terapisinde patuline olan ilgiyi desteklemektedir. İnsanlarda tütünün neden olduğu akciğer kanserini taklit eden ve kimyasal olarak indüklenen akciğer karsinojenez modellerini kullanarak daha fazla in vivo deney yapılabilir. Böylece patulin ve akciğer kanseri arasındaki bilinmeyen yönler aydınlatılmış olur. Patulin türevleri üzerinde daha fazla araştırma yapılması, daha az toksisiteye sahip ilginç aktif bileşiklerin keşfedilmesine yol açabilir [26]. Beslenme

yoluyla patulin maruziyetine ek olarak, solunum yoluyla maruziyet te mümkündür. Akciğerde lokal etkilere neden olur. Solunan patulinin potansiyel lokal etkisini değerlendirmeye yönelik in vitro bir çalışma yapılmıştır. V79 hücre hattında patulinin de aralarında olduğu14 farklı mikotoksinin sitotoksisitesi belirlenmiştir. Yeterli miktarlarda solunduğunda, akciğer hücrelerinde göz ardı edilemeyecek lokal yan etkiler gözlenmiştir [27]. Akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalar bahsedilen bu çalışmalarla sınırlıdır. Karaciğer kanseri ile ilişkisi konusunda ise literatür verisine rastlanmamıştır. Çalışmamız karaciğer kanseri ile ilişkisi konusundaki ilk verileri sunmaktadır. Uygun dozlarda patulinin karaciğer ve akciğer kanseri tedavisi için aday bir molekül olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmada kullanılan kanser hücre dizilerinin insana özgü olması çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların önemini artırmaktadır. Patulinin antikanser etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için hem *in vitro* hem de *in vivo* daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TSG-2020-2087 numaralı İUBAP (İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi) tarafından desteklenmiştir.

YAZAR KATKILARI

Kavram*: S.Ü., N.B.T., H.Y.;* Tasarım: *N.B.T., D.A.Ö., S.Ü.*; Denetim: *S.Ü., H.Y.;* Kaynaklar: *H.Y., N.B.T.;* Malzemeler: *H.Y., A.D., S.Ş;* Veri Toplama ve/veya işleme: *E.B., A.D., S.Ş. N.B.T.;* Analiz ve/veya yorumlama: *E.B., S.Ş., A.D., S.Ü.;* Literatür taraması: *S.Ü., N.B.T.;* Makalenin yazılması: *S.Ü., H.Y.;* Kritik inceleme: *S.Ü., N.B.T, D.A.Ö.;* Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ismaiel, A.A., Papenbrock, J. (2017). Effect of patulin from penicillium vulpinum on the activity of glutathione-S-transferase and selected antioxidative enzymes in Maize. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 14*(7), 825. [CrossRef]

2. Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P. (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins (Basel), 2*(4), 613-631. [CrossRef]

3. Liu, B.H., Yu, F.Y., Wu, T.S., Li, S.Y., Su, M.C., Wang, M.C., Shih, S.M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology, 191*(3), 255-63. [CrossRef]

4. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. IARC; Lyon, France: 1986. Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation; pp. 83-98.

5. Abastabar, M., Akbari, A., Akhtari, J., Hedayati, M. T., Shokohi, T., Mehrad-Majd, H., Ghalehnoei, H., Ghasemi, S. (2017). In vitro antitumor activity of patulin on cervical and colorectal cancer cell lines. *Current Medical Mycology, 3*(1), 25-29. [CrossRef]

6. Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Prola, A., Guilbert, A., Bacha, H., Abid-Essefi, S., Lemaire, C. (2015). Patulin induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. *Toxicological Sciences, 144*(2), 328-337. [CrossRef]

7. Pal, S., Singh, N., Ansari, K. M. (2017). Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicology Research, 6*(6), 764–771. [CrossRef]

8. Liu, J., Liu, Q., Han, J., Feng, J., Guo, T., Li, Z., Min, F., Jin, R., Peng, X. (2021). N-Acetylcysteine inhibits patulin-induced apoptosis by affecting ROS-mediated oxidative damage pathway. *Toxins, 13*(9), 595. [CrossRef]

9. Barltrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., Cory, J.G. (1991). 5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3- (4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1*(11), 611-614. [CrossRef]

10. Liang, C.C., Park, A., Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols, 2*(2), 329-333. [CrossRef]

11. Demirci, S., Doğan, A., Türkmen, N. B., Telci, D., Rizvanov, A. A., Şahin, F. (2017). Schiff base-Poloxamer P85 combination demonstrates chemotherapeutic effect on prostate cancer cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 86*, 492-501. [CrossRef]

12. Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C. (2004). Penicillium expansum: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(8), 2421-2428. [CrossRef]

13. Kwon, O., Soung, N. K., Thimmegowda, N. R., Jeong, S. J., Jang, J. H., Moon, D. O., Chung, J. K., Lee, K. S., Kwon, Y. T., Erikson, R. L., Ahn, J. S., Kim, B. Y. (2012). Patulin induces colorectal cancer cells apoptosis through EGR-1 dependent ATF3 up-regulation. *Cellular Signalling, 24*(4), 943-950. [CrossRef]

14. Liu, B. H., Wu, T. S., Yu, F. Y., Wang, C. H. (2006). Mycotoxin patulin activates the p38 kinase and JNK signaling pathways in human embryonic kidney cells. *Toxicological Sciences, 89*(2), 423-430. [CrossRef]

15. Guo, X., Dong, Y., Yin, S., Zhao, C., Huo, Y., Fan, L. (2013). Patulin induces pro-survival functions via autophagy inhibition and p62 accumulation. *Cell Death Disease, 4*(10), e822. [CrossRef]

16. Ferrer, E., Juan-García, A., Font, G., Ruiz, M. J. (2009). Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicology In Vitro, 23*(8), 1504-1509. [CrossRef]

17. Alves, I., Oliveira, N., Laires, A., Rodrigues, A., Rueff, J. (2000). Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis, 15*(3), 229-34. [CrossRef]

18. Burghardt, R. C., Barhoumi, R., Lewis, E. H., Bailey, R. H., Pyle, K. A., Clement, B. A., Phillips, T. D. (1992). Patulin-induced cellular toxicity: a vital fluorescence study. *Toxicology and Applied Pharmacology, 112*(2), 235-244. [CrossRef]

19. Turkmen, N. B., Yuce, H., Ozek, D. A., Aslan, S., Yasar, S., Unuvar, S. (2021). Dose dependent cytotoxic activity of patulin on neuroblastoma, colon and breast cancer cell line. *Annals of Medical Research, 28*(9), 1767-1770. [CrossRef]

20. Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Rjiba-Touati, K., Bouyahya, C., Neffati, F., Najjar, M. F., Bacha, H., Abid-Essefi, S. (2016). The potential effect of patulin on mice bearing melanoma cells: an anti-tumour or carcinogenic effect? *Tumour Biology, 37*(5), 6285-6295. [CrossaRef]

21. Wu, T. S., Liao, Y. C., Yu, F. Y., Chang, C. H., Liu, B. H. (2008). Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Toxicology Letters, 183*(1-3), 105-111. [CrossRef]

22. Luft, P., Oostingh, G. J., Gruijthuijsen, Y., Horejs-Hoeck, J., Lehmann, I., Duschl, A. (2008). Patulin influences the expression of Th1/Th2 cytokines by activated peripheral blood mononuclear cells and T cells through depletion of intracellular glutathione. *Environmental Toxicology, 23*(1), 84-95. [CrossRef]

23. Jin, H., Yin, S., Song, X., Zhang, E., Fan, L., Hu, H. (2016). p53 activation contributes to patulin-induced nephrotoxicity via modulation of reactive oxygen species generation. *Scientific Reports,* 6, 24455. [CrossRef]

24. Zhou, S. M., Jiang, L. P., Geng, C. Y., Cao, J., & Zhong, L. F. (2010). Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicon, 55*(2-3), 390-395. [CrossRef]

25. Saxena, N., Ansari, K. M., Kumar, R., Dhawan, A., Dwivedi, P. D., Das, M. (2009). Patulin causes DNA damage leading to cell cycle arrest and apoptosis through modulation of Bax, p(53) and p(21/WAF1) proteins in skin of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology, 234*(2), 192-201. [CrossRef]

26. Monteillier, A., Allard, P. M., Gindro, K., Wolfender, J. L., Cuendet, M. (2018). Lung Cancer Chemopreventive Activity of Patulin Isolated from Penicillium vulpinum. *Molecules (Basel, Switzerland), 23*(3), 636. [CrossRef]

27. Behm, C., Föllmann., W., Degen, G.H. (2012). Cytotoxic potency of mycotoxins in cultures of V79 lung fibroblast cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, 75*(19-20), 1226-31. [CrossRef]