

Zearalenonenin Toksik Etkilerine Karşı *Drosophila melanogaster*' de Folik Asidin İyileştirici Etkileri

Hakan Aşkın*, Handan Uysal, Deniz Altun

Atatürk Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 25240, Erzurum

*hakanbiyolog@gmail.com

Özet

Bu çalışmada, bir çeşit mikotoksin olan zearalenon (ZE)'un farklı konsantrasyonlarının *Drosophila melanogaster*'in yabanıl (=Oregon) tip ergin bireyleri üzerindeki etkisi ve buna karşı folik asidin koruyucu etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. ZE, genellikle depolanmış tahıl ürünlerinin kontaminasyonu ile oluşmakta ve canlılar tarafından alındığında çeşitli toksik etkiler meydana getirmektedir. Bir çeşit B vitamini türevidir olan folik asit (FA) ise günümüzde toksik etkili bileşiklere karşı antagonist olarak kullanılmaktadır. Farklı konsantrasyonlarda ZE (25 , 75 , 125 ve 175 µM) ve ZE + FA' nın sulu çözeltileri ergin bireylerin besiyerlerine ilave edilmiştir. Tüm uygulama gruplarında kronik olarak ZE uygulamasına maruz bırakılan ebeveynlerin F1 nesline ait yavruların gelişim evreleri, kontrol grubuna göre çeşitli evrelerde gecikmeli olarak meydana gelmiş ancak hiçbir uygulama grubunda yeni yavru birey elde edilememiştir. ZE + FA uygulamasında ise, ZE'nin bu toksik etkilerinin tümüyle ortadan kalktığı ve yeni yavru bireylerin oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum istatistiksel olarak P < 0.005 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *D. melanogaster*, Zearalenone, Folik Asit, Gelişim Biyolojisi, Teratojenik Etki

Giriş

Zearalenon, bazı *Fusarium spp.* türleri tarafından ikincil metabolit olarak üretilen ve steroid olmayan östrojenik bir mikotoksindir. Bu mikotoksinin, mısır, arpa, yulaf, buğday ve pirinç gibi bir çok tahılda bulunduğu bilinmektedir (1). Koch (2)' a göre kuvvetli östrojenik etkili olan ZE, fareler, sıçanlar, hamsterlar ve gine domuzları gibi çeşitli hayvanların üreme sistemlerinde dejenerasyonlara yol açmaktadır. ZE ile muamele edilmiş farelerin özellikle uterus ve testislerdeki intersititial hücreleri ve ovaryum foliküllerinde ZE'nin kuvvetli yayılım gösterdiği bulunmuş ve hatta ZE'ye adipoz dokuda da rastlanmıştır (1). Perry ve Miller (3) ise *Musca domestica* (=ev sineği) larvalarını folik asit ile beslemiş ve folik asidin normal gelişim ve metamorfoz için önemli olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca folik asit eksikliğinde bu larvalarda DNA ve RNA sentezinin azaldığı da tespit edilmiştir. Spiegelstein vd. (4)'ne göre de sıçanlarda folik asit eksikliğinde arsenik, teratojenik etkiye sebep olmaktadır. Çalışmamızda biyolojisi çok iyi bilinen ve

kontrollü çaprazlama imkanı sağlayan *D. melanogaster*'in gelişimi üzerine ZE ve ZE + FA'nın etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Deneylerimizin tümünde *D. melanogaster* (Diptera: Drosophilidae)'in yabancıl tip (wild type = w.t.) Oregon R soyu kullanılmıştır. Ergin bireylere ZE ve ZE + FA uygulamaları için biri kontrol diğeri deney grubu olmak üzere ikişer deney seti hazırlanmıştır. Tüm deney gruplarıyla ilgili besi ortamlarına ait içerikler Çizelge 1' de verilmiştir. Bu şekilde hazırlanan kültür şişelerinde *D. melanogaster* 'in ergin bireyleri bire bir eşleşmişlerdir ve gelişimle ilgili incelemeler daha önceki çalışmalarımıza uygun olarak yapılmıştır (5). Elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Çizelge 1. Bu çalışmada kullanılan farklı besi ortamlarının içerikleri

Besiyeri no	Besi ortam içerikleri		
	SDB(ml)	ZE(μ M)	FA(μ M)
Kontrol	100	—	—
I	100	25	—
II	100	50	—
III	100	100	—
IV	100	125	—
V	100	25	25
VI	100	50	50
VII	100	100	100
VIII	100	125	125

Bulgular ve Tartışma

Bu amaçla, önce farklı konsantrasyonlarda ZE sonra ZE + FA çözeltilerini içeren besi ortamlarında yetiştirilen *D. melanogaster* 'in gelişim evreleri incelenmiştir. Yalnızca ZE içeren tüm uygulama grupları ile kontrol grubunda çaprazlamadan sonraki ilk gün ebeveynlerin yumurta bıraktığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda yumurtadan sonra larvadan ergine, tüm gelişim evreleri 9. günde tamamlanırken deney gruplarında artan ZE konsantrasyonuna bağlı olarak I-III nolu uygulama gruplarında IV nolu uygulama grubunda ise gelişimin tamamlanamadığı tespit edilmiştir (çizelge 2). Çizelge 2'de de görüldüğü gibi, uygulama gruplarının tümünde gelişimin çeşitli evrelerden sonra tamamlanamaması sebebiyle F₁' e ait bireyler de elde edilememiştir. ZE' nin bu toksik etkilerine karşı ZE ile birlikte FA çözeltileri ergin bireylerin besiyerlerine ilave edilmiştir. Tüm uygulama gruplarında gelişim evrelerinin aynı sürede tamamlandığı görülmüştür. Ayrıca uygulama gruplarının tümünde yavru birey oluşumu gözlenirken artan FA konsantrasyonuna bağlı olarak yavru birey sayısında da artış tespit edilmiştir (çizelge 2). Kontrol grubunda 828 birey elde edilirken V–VIII nolu besiyerlerinden elde edilen birey sayıları 852–945 arasında değişmektedir. Bu artış kontrole göre P < 0.005 düzeyinde önemli bulunmuştur. Zearalenon, bir küf cinsi olan *Fusarium*'un sekonder metabolitidir. Bu metabolit, doğrudan bir toksin olmayıp

hormon benzeri özellik gösterir ve çeşitli östrojenik hastalıklara neden olabilmektedir (6). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, farklı konsantrasyonlarda ZE uygulaması, holometabol olan *D. melanogaster*'in F₁ bireylerine ait gelişim evrelerinde önemli gecikmeye sebep olmuştur. Çizelge 2'de, özellikle III ve IV nolu uygulama gruplarında, bu gecikme açıkça görülmektedir. Ayrıca larval ve pupal evrelerin inhibisyonu nedeniyle (I – IV nolu uygulama grupları) F₁'e ait birey elde edilememiş olması da oldukça önemlidir. Benzeri sonuçlar Beard ve Walton (6)'un araştırmalarında da görülmüş ve ZE uygulamasıyla *Musca domestica*' da larval ve pupal evrede gelişim geriliği yada bu safhaların hiç meydana gelmediği saptanmıştır. ZE ile aynı grupta yer alan AFB₁' in de *D. melanogaster*' de çeşitli gelişimsel anormalliklere sebep olduğu bildirilmiştir (7). Daha önce yapılmış bir başka çalışmaya göre, ZE ile kontamine olan yemlerle beslenen ergin hayvanların (fare, sıçan, hamster ve gine domuzu gibi) üreme sistemlerinde hipertrofi ve atrofi gözlenmiştir (8). Büyük bir olasılıkla *D. melanogaster*' in ergin bireylerinin üreme sistemlerinde de bu tip hasarlar meydana gelmiş olabilir. Buna bağlı olarak ZE'den kaynaklanan toksik etkiler nedeniyle sperm ve yumurta yapısının bozulmuş olması yada dişilerin bıraktığı yumurtaların açılmamış olması kuvvetle muhtemeldir. Ayrıca gelişim evreleri uzayan ve deri değişimini zamanında tamamlayamayan *Rhithropanopeus harrisii* larvalarının hayatta kalmaları zorlaşmakta ve larvalarda toplu ölümler meydana gelmektedir (9). Tüm mikotoksinler gibi ZE' de DNA, RNA ve protein gibi hücrel makromoleküllere bağlanırlar (9) ve onların sentezini inhibe ederler. McLean ve Dutton (10)' a göre ZE uygulamasına bağlı olarak DNA'ya bağlı RNA polimeraz aktivitesi de engellenmektedir. Ayrıca homeotik genlerde meydana gelebilen hasarlar imajinal disk oluşumunu engellerler yada gelişimsel genlerin transkripsiyonu sırasında ki hatalarda gelişimi engelleyebilir (11).

Çizelge 2. *D. melanogaster*'in ergin bireylerine uygulanan ZE ve ZE + FA'nın gelişim evreleri ve F₁ e ait toplam birey sayısı üzerine etkileri

Gelişim evreleri	K	Uygulama grupları							
		ZE için				ZE + FA için			
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Yumurta	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1. evre larva	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2. evre larva	3	3	4	5	--	3	3	3	3
3. evre larva	4	5	6	7	--	4	4	4	4
Prepupa	5	6	8	--	--	5	5	5	5
Pupa	7	8	--	--	--	7	7	7	7
Ergin	9	--	--	--	--	9	9	9	9
Σ F ₁	828 ^a	--	--	--	--	852 ^a	870 ^a	900 ^b	945 ^b

Çalışmamızın ikinci aşamasında kullandığımız folik asit (FA) ise ZE'nin tüm olumsuz etkilerini ortadan kaldıracak etki göstermiştir. ZE ve FA'yı birlikte içeren V-VIII uygulama gruplarımızda hem F₁'e ait bireylerin gelişim evrelerinin kontrol grubuyla aynı zamanda tamamlandığı hem de yavru birey oluşumunun teşvik edildiği görülmüştür (çizelge 2). Öyleki FA artışına bağlı olarak yavru birey

sayısındaki artış $P < 0,005$ düzeyinde önemli bulunmuştur. FA' nın çeşitli kimyasallara karşı iyileştirici etkileri Finnell vd..(12) tarafından da gözlenmiştir. Bu araştırmacılar memelilerde folik asit ile embriyonal gelişimin teşvik edildiğini ve konjenital malformasyonların genetik faktörler kadar eksik beslenmeye bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Kaur ve Srivastova (13)' ya göre B- vitaminleri, folik asit ve biyotin eksikliğinde *Dacus cucurbitae* (kavun meyve sineği)'de yumurtlama ve yumurtaların yaşayabilirliği azalmaktadır. Güney vd. (14) yaptıkları araştırma sonucunda, fenitoin' nin neden olduğu nöral tüp defektlerinin folik asit kullanımı ile azaldığını belirlemişlerdir. Fitokimyasallar, sahip oldukları antioksidant etkileri sayesinde birçok olumsuz duruma karşı koruyucu ve iyileştirici etkiye sahiptirler (14). Aynı zamanda bu maddeler segmentasyonun son basamağında özellikle sinir sistemi oluşurken hücre farklılaşmasını olumlu yönde etkileyerek konjenital malformasyonların meydana gelme yüzdesini önemli derecede azaltmaktadır. Ayrıca, karsinojen özelliği gideren enzimlerin aktivitesi artırarak tümör oluşumu ve kanserleşmede önemli rol oynayan nitrozamin oluşumunu engelleyerek etkilerini gösterirler. Fitokimyasallar barsak florasını, safra asitlerini ve pH'yı düzenledikleri gibi intrasellüler matrikslerin bütünlüğünün korunmasını üstlenerek hücrenin dış etkenlere karşı korunmasını da sağlarlar. DNA'nın tamirinde de önemli işlevlere sahip olan çeşitli fitokimyasallar bu özelliklerinden dolayı DNA'da meydana gelebilecek hasarlara karşı önemli bir rol üstlenirler. Kanser hücrelerinde apoptosisi (programlanmış hücre ölümleri) artırma özelliklerinin yanısıra hücre proliferasyonunu (çoğalmasını) önleyerek kanserleşmiş dokulardaki yayılımı azaltırlar.

Sonuç

Bir çeşit fitokimyasal olan folik asitin de *D. melanogaster'* de çeşitli gelişim özelliklerini olumsuz etkileyen ZE' nin etkilerini yukarıda sayılan mekanizmalar ile önlemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak yapılacak yeni çalışmalar ile konunun daha da aydınlatılması sağlanmış olacaktır.

Kaynaklar

1. Kuiper-Goodman T, Scott PM, Watanabe H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. Regul. Toxicol. Pharmacol., 7, 253-306.
2. Koch H. 1981. Leitfaden der Medizinischen Mykologie, Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, p. 150.
3. Perry AS, Miller S. 1965. The essential role of folic acid and the effect of antimetabolites on growth and metamorphosis of housefly larvae *Musca domestica* L. J. Insect Physiol., (11), 1277-1287.
4. Spiegelstein O, Gould A, Włodarczyk B, Tsie M, Lu X, Le C, Troen A, Selhub J, Piedrahita JA, Salbaum JM, Kappen C, Melnyk S, James J, Finnell RH. 2005. Developmental consequences of in utero sodium arsenate exposure in mice with folate transport deficiencies. Tox. Appl. Phar. 203(1), 18-26.
5. Uysal H, Aşkın H. 2007. The Effect of Chronic Phenol Exposure via Diet on Developmental Stages of *D. melanogaster*. Fresenius Environmental Bulletin. 16, (9a): 991-997.
6. Beard RL, Walton GS. 1971. Insecticidal mycotoxins produced by *Aspergillus flavus* var. *colunaris*. Bull. Conn Agr. Exp. Sta. 725, 1-26.
7. Şişman T, Uysal H, Aşkın H. 2005. The clastogenic effects of Aflatoxin B1 on polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Drosophila Information Service, 88:1-6.
8. Topçu A, Tayfur M. 1999. Fusariotoksikozis (F-2, FES) Zearalenone, Gıda, 24(5):343-347.
9. Cripe GM, McKenney CL, Høglund MD, Harris PS. 2003. Effects of fenoxycarb exposure on complete larval development of the xanthid crab, *Rhithropanopeus harrisi*. Env. Pol. (125), 295-299.
10. McLean M, Dutton MF. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. Pharmacol. Ther., 65, 163-192.
11. Wallace RA. 1991. *The Science of Life*. Harper Collins Publishers Inc., New York.
12. Finnell RH, Shaw GM, Lammer EJ, Brandl KL, Carmichael SL, Rosenquist TH. 2004. Gene-nutrient interactions: importance of folates and retinoids during early embryogenesis. Toxicology and Applied Pharmacology, (198), 75-85.
13. Kaur S, Srivastava BG. 1991. Effect of B-vitamins on various parameters of reproductive potential of *Dacus cucurbitae* (Coquillett). Indian J. Entomol. (53), 543-547.
14. Güney O, Canbilen A, Konak A, Acar O. 2003. The effects of folic acid in the prevention of neural tube development defects caused by phenytoin in early chick embryos. Spine., 28(5), 442-5.