

**ALTHAEA OFFICINALIS L. BİTKİSİNİN ANTİGENOTOKSİK AKTİVİTESİNİN
DROSOPHILA MELANOGASTER'DE ARAŞTIRILMASI**

**Investigation of Antigenotoxic Effects of *Althaea officinalis* L. in *Drosophila
Melanogaster***

Aygül KILIÇ KARABULUT¹ 

¹Munzur Üniversitesi, Tunceli Meslek Yüksekokulu, Tunceli

Geliş Tarihi / Received: 31.01.2022

Kabul Tarihi / Accepted: 26.09.2022

ÖZ

Bu çalışmada, tıbbi öneme sahip bir bitki olan ve pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan *Althaea officinalis* L. bitkisinin antigenotoksik etkisi çalışıldı. Bu amaçla somatik mutasyon ve rekombinasyonu ölçen ve *in vivo* bir test olan *Drosophila* kanat benek testi (SMART) kullanıldı. Mitomisin C (MMC) mutajenine karşı *A. officinalis* bitkisinin antigenotoksik etkisi araştırıldı. Çalışmalar sonrasında, *A. officinalis* bitkisinin kurutulmuş herbasının 5 mg, 15 mg ve 45 mg'lık dozlarda MMC'nin oluşturduğu DNA hasarını baskılayabileceği saptandı. 5mg, 15mg ve 45mg'lık doz uygulanması sonucunda, MMC ile indüklenen toplam benek sayılarının sırasıyla %3.66, %1.83 ve %2.03 oranında inhibe edildiği saptanmıştır. Elde edilen verilere göre *A. officinalis* bitkisinin birtakım antigenotoksik faktörler içerdiği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: *Althaea officinalis*, Antigenotoksosite, *Drosophila melanogaster*, Mitomisin C (MMC), SMART.

ABSTRACT

In this study, the antigenotoxic effect of *Althaea officinalis* L., which is a medicinal plant and is widely used in the treatment of many diseases, was studied. For this reason, the *Drosophila* wing spot test (SMART), an *in vivo* test that measures somatic mutation and recombination, was used. The antigenotoxic effect of *A. officinalis* against the mitomycin C (MMC) mutagen was investigated. After application studies, it was determined that 5 mg, 15 mg and 45 mg doses of dried herba of *A. officinalis*, could suppress DNA damage caused by MMC. As a result of the application of 5mg, 15mg and 45mg doses it was determined that the total number of spots induced by MMC was inhibited by 3.66%, 1.83% and 2.03%, respectively. According to the data obtained, it is thought that *A. officinalis* contains some antigenotoxic factors.

Keywords: *Althaea officinalis*, Antigenotoxicity, *Drosophila melanogaster*, Mitomycin-C (MMC), SMART.

GİRİŞ

Genetik materyal üzerinde kendiliğinden ya da indüklenme ile oluşan değişiklikler mutasyon olarak tanımlanırken, mutasyona neden olan fiziksel ya da kimyasal etmenler ise mutajen olarak adlandırılır. Bu mutajenler, sonraki nesillere genetik hasarın aktarımı ve kanser oluşumu gibi somatik hücre hasarının ortaya çıkmasına neden olan süreçleri tetiklediği için önemlidir.

DNA üzerindeki hasar olarak tanımlanan genotoksik etki, DNA hasarıyla ilişkili hastalıkların ortaya çıkması ve kanser başlatıcı bir süreç olduğu için genetik toksikolojinin ana konusunu oluşturmaktadır (Sümer, Öner, Ögüş ve Açık, 2009).

Geleneksel amaçlı kullanılan pek çok tıbbi bitki, yeni ilaçların keşfinde büyük önem taşımaktadır. Bu bitkilerin farklı bölümlerinden pek çok bileşik ekstrakte edilmektedir. Bunlara; pektin, nişasta, flavonoid, kumarin, tannin, asparagin ve birçok aminoasit örnek olarak verilebilir (Şeker, 2019). Etkinliği kanıtlanmış birçok metabolite sahip olan bu bitkilerin tedavi edici ve antigenotoksik etkilerine yönelik ilgi giderek artmaktadır (Shabab, Gholamnezhad ve Mahmoudabady, 2021). Dolayısıyla çeşitli mutajenlerin etkisiyle ortaya çıkan genotoksik etki, tıbbi bitkilerin antigenotoksik etkisine bağlı olarak azalabilmektedir. Bu bakımdan pek çok bitki antigenotoksik etki göstermesi bakımından büyük öneme sahiptir (Önen, Kılıçle ve Doğan, 2017).

Yapılan çeşitli çalışmalarla pek çok bitkinin kalp hastalıkları, yüksek tansiyon ve astım gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan tıbbi ilaçların önemli bir kısmının temelini oluşturduğu rapor edilmiştir (Al-Snafi, 2013).

Bu bağlamda *Althaea officinalis* L. bitkisinin (Hatmi çiçeği) geleneksel tıpta 2000 yılı aşkın süredir kullanıldığı bilinmektedir. Müsilaj içeriğiyle zengin bir bitki olan *A. officinalis* bitkisinin özellikle çiçekleri ve yaprakları tarafından hazırlanan karışımın boğaz ağrısı, üst solunum yolu enfeksiyonları, öksürük, sindirim kaynaklı karın ağrıları ve atopik egzema gibi rahatsızlıklarda, farklı şekillerde hazırlanarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Kaya, 2013; Khalighi vd., 2021).

Malvaceae familyasına ait bir bitki olan hatmi çiçeğinin genellikle ılıman bölgelerde yayılış gösterdiği ve bu bitkinin 20 kadar türünün bulunduğu rapor edilmiştir. Bu türlerden biri olan *A. officinalis* ülkemizde de doğal olarak bulunmaktadır (Özdemir, 2018). Ayrıca ülkemizde, aktarlarda “hatmi” adıyla bitkinin kök, yaprak ya da çiçek gibi farklı kısımları satılmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan ve ökaryotik bir organizma olan *Drosophila melanogaster* (sirke sineği), üretiminin kolay ve ekonomik olması ve genetik olarak farklı soylara sahip olması gibi özellikleri nedeniyle pekçok maddenin mutajenik, genotoksik, kanserojenik ve antigenotoksik etkilerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Özellikle insan ve *Drosophila*'nın genetik özelliklerinin benzerlik göstermesi, *Drosophila*'yı bu tip çalışmalar için oldukça avantajlı kılmaktadır (Rincon ve Graf, 1995).

Bu çalışmayla, Mitomisin-C (MMC) ile oluşan genotoksik etkiye karşı, *A. officinalis* bitkisinin antigenotoksik etkisinin *Drosophila* kanat benek testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada *D. melanogaster*'in *mwh/mwh* ve *flare-3* soyları kullanılmıştır (Rincon ve Graf, 1995). Mutajen olarak Mitomisin C (CAS No. 50-07- 7) kullanıldı. Antigenotoksik etkisi incelenecek olan Malvaceae familyasına dahil *A. officinalis* bitkisi, Malatya Turgut Özal Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler bahçesinde yetiştirilmiştir. Herbaryum tekniklerine göre kurutulmuş olan bitkinin, herba adı verilen toprak üstü kısımları toz haline getirilerek kullanılmıştır.

Antigenotoksik Uygulama

Çalışmada, *A. officinalis* bitkisinin cam bir havan içerisinde ezilerek toz haline getirilmiş kuru herba kısımlarının genotoksik ve antigenotoksik etkilerini belirlemek amacıyla, 5 mg, 15 mg ve 45 mg'lık dozları kullanılmıştır. Bu dozların MMC'ye karşı antigenotoksik etkilerini belirlemek için, MMC'nin 0.05 mM'lık dozu kullanılmıştır. Bunun için steril deney tüplerine, 0.5gr hazır besiyeri (Formula 4–24; Carolina Biological Supply) içerisinde 5 mg, 15 mg ve 45 mg olacak şekilde toz haldeki *A. officinalis* eklenmiştir.

Uygulama Prosedürü

Uygulama prosedürü birtakım değişiklikler yapılarak, belli bir protokole göre gerçekleştirildi (Graf vd., 1984). *Mwh* erkekleri ve *flr³* virgin dişilerinin 8 saatlik çaprazı sonucu elde edilen yumurtalardan gelişen 72±4 saatlik larvalar, %17'lik sodyum klorür çözeltisi kullanılarak toplandı. Bu larvalar gruplara özgü hazırlanmış besiyeri içeren tüplere sayılarak konuldu. Bu şekilde negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak MMC gruplarının yanı sıra, *A. officinalis* ve MMC + *A. officinalis* grupları da oluşturuldu.

Kanat Preparatlarının Hazırlanması ve Mikroskopik Analizi

Çalışmada mikroskopik analiz için, deney tüplerindeki larvalardan ergine gelişen bireylerden sadece trans-heterozigot (*mwh flr+/mwh+flr³*) bireyler kullanıldı. Ergin sineklerin kanatları kesildi ve Faure solüsyonunun (30 gr arap zımkı, 20 ml gliserol, 50 gr kloralhidrat ve 50 mL distile su) damlatıldığı lamaların üzerine yerleştirildi. Yerleştirilen kanatların her iki yüzeyi ışık mikroskopunda 400X büyütme ile incelendi. İnceleme sonucunda gözlenen benek tipleri, tekli benekler ve ikili benekler olmak üzere kaydedildi (Rincon ve Graf, 1995).

İstatistiksel Analiz

Mikroskopik tarama ile gözlenen benekler; küçük tekli benek, büyük tekli benek ve ikili benek şeklinde kaydedildi. İstatistiksel olarak analiz yapabilmek için, her bir kanattaki benek sayısı, kontrol gruplarının benek sayıları ile karşılaştırıldı. Sonuçları değerlendirmek için, MICROSTA paket programı kullanıldı ve tek yönlü Kastenbaum-Bowman testi yapıldı. *A. officinalis* bitkisinin MMC ile oluşan kanat benek sıklığı inhibisyon yüzdesi ise aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Idaomar vd., 2002).

$$\frac{100(a-b)}{a}$$

Yukarıdaki formüle göre a MMC ile oluşan benek sıklığını, b ise *A. officinalis* uygulaması sonucu MMC ile oluşan benek sıklığını göstermektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Günlük yaşantımızda sıklıkla kullandığımız pek çok bitkinin, sahip olduğu bileşenler sayesinde birçok kanser türünün ve diğer somatik mutasyonla ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanıldığı ve antigenotoksik aktivite gösterdiği bilinmektedir. Yani tipteki mutajenlerin etkisine bağlı olarak oluşan mutajenik etki, bu bitkilerin sahip olduğu bileşenlerin antigenotoksik etkisine bağlı olarak azalmaktadır (Boldbaatar vd., 2014; Zor ve Aslan, 2020).

Bu çalışmada, toz haline getirilmiş *A. officinalis* bitkisinin toprak üstü kısımlarının, sahip olduğu pek çok avantajı sayesinde, birçok bileşenin genotoksik ve antigenotoksik etkisinin değerlendirildiği *D. melanogaster* üzerindeki antigenotoksik etkisi *Drosophila* kanat benek testi ile araştırılmıştır. Çeşitli bitki özütlerinin antimutajenik etkilerinin çalışıldığı ve model organizma olarak *Drosophila*'nın kullanıldığı pek çok çalışma olmasına rağmen, bu çalışma *A. officinalis* bitkisinin *Drosophila* üzerindeki antigenotoksik etkisinin kanat benek testi ile araştırıldığı ilk çalışma özelliği taşımaktadır (Radak ve Andjelkovic, 2016).

Çalışmada, *A. officinalis* bitkisinin toz edilmiş kuru herbasi 5 mg, 15 mg ve 45 mg'lık dozlarda kullanıldı. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan, antibakteriyel, antitümör ve antifungal etkiye sahip olan ve alkilleyici ajan sınıfına giren MMC'nin ise 0.025mM, 0.05mM ve 0.1mM'lık dozları kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucu MMC'nin *Drosophila*'da genotoksik etkisi saptanırken, *A. officinalis* bitkisinin test edilen bütün dozlarında, tüm benekler için kontrol grubuna (distile su) kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Literatürde, *Streptomyces caespitosus*'tan elde edilen bir antibiyotik olan MMC'nin *Drosophila*'da genotoksik etkiye neden olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (El-Hefny vd., 2020; Karabulut ve Yesilada, 2014; Niikawa ve Nagase, 2007). Çalışmada ayrıca her bir uygulama grubuna bağlı olarak gözlenen, yaşama yüzdeleri de hesaplandı. Elde edilen tüm bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler Tablo 1 ve Tablo 2'de görülmektedir.

Tablo 1. MMC Test Gruplarında *Drosophila* Kanat Benek Testi Verileri ve İstatistiksel Analizler

Test Grupları	Yaşama yüzdesi (%)	İncelenen Kanat Sayısı	Kanat başına düşen benek sayılarının istatistiksel analizi*			
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Distile Su	93	90	0.11(10)	0.01(1)	0.01(1)	0.13(12)
MMC (mM)						
0.025	66	65	1.32(86) +	0.45(29) +	0.12(8) +	1.89(123) +
0.05	56	52	3.05(177) +	1.07(62) +	0.29(17) +	4.41(256) +
0.1	33	50	4.96(248) +	1.62(81) +	0.6(30) +	7.18(359) +

*Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, $\alpha=\beta=0.05$

Tablo 2. *A. officinalis* Test Gruplarında *Drosophila* Kanat Benek Testi Verileri ve İstatistiksel Analizler

Test Grupları	Yaşama yüzdesi (%)	İncelenen Kanat Sayısı	Kanat başına düşen benek sayılarının istatistiksel analizi*			
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Distile Su	93	90	0.11(10)	0.01(1)	0.01(1)	0.13(12)
<i>A. officinalis</i>(mg)						
5	80	80	0.12(10) i	0.025(2) i	0.01(1) i	0.16(13) i
15	78	81	0.11(9) i	0.01(1) i	0.02(2) i	0.15(12) i
45	74	76	0.12(9) i	0.01(1) i	0.03(2) i	0.16(12) i

*Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, $\alpha=\beta=0.05$

Genotoksik etkisi belirlenen MMC'ye karşı *A. officinalis* bitkisinin antigenotoksik etkisini belirlemek amacıyla, 5 mg, 15 mg ve 45 mg'lık dozlarda kurutulmuş herba, 0.05mM MMC içeren hazır besi yerine eklendi. Tüm gruplarda 40-50 kanat benek varlıklarını araştırmak amacıyla tarandı. Benek sayıları incelendiğinde, MMC gruplarına oranla, tüm MMC+ *A. officinalis* gruplarında tüm benek sayılarının azaldığı gözlenerek, bu azalmanın istatistiksel olarak negatif etkiye sahip olduğu belirlendi. Ayrıca *A. officinalis* bitkisinin test edilen tüm

dozları ile 0.05 mM MMC'nin eş zamanlı uygulanması sonucu, *A. officinalis* bitkisinin MMC tarafından oluşan benek sayılarını inhibisyon yüzdeleri de hesaplandı. Buna göre 5 mg *A. officinalis* dozunun test edilen diğer dozlardan (15 mg ve 45 mg) daha yüksek oranda inhibisyon yüzdesine sahip olduğu belirlendi. *A. officinalis* bitkisinin 5mg, 15mg ve 45mg'lık dozlarının uygulanması sonucunda, MMC ile indüklenen toplam benek sayılarının sırasıyla %3.66, %1.83 ve %2.03 oranında inhibe edildiği saptanmıştır. Kanat benek testinden elde edilen bulgular Tablo 3'te görülmektedir.

Tablo 3. MMC+ *A. Officinalis* Test Gruplarında *Drosophila* Kanat Benek Testi Verileri ve İstatistiksel Analizler

Test Grupları	Yaşama yüzdesi (%)	Kanat Sayısı	Kanat başına düşen benek sayılarının istatistiksel analizi*				İnh. %
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)	
MMC (0,05mM)	56	52	3.40(177)	1.19(62)	0.33(17)	4.92(256)	
MMC+A. officinalis (mg)							
5	59	50	3.30(165) -	1.16(58) -	0.28(14) -	4.74(237) -	3.66
15	55	47	3.40(160) -	1.11(52) -	0.32(15) -	4.83(227) -	1.83
45	60	45	3.35(151) -	1.15(52) -	0.31(14) -	4.82(217) -	2.03

*Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, $\alpha=\beta=0.05$

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmayla öncelikle herbaryum tekniklerine göre kurutulmuş olan ve toprak üstü kısımları (yaprak ve çiçek) alınarak toz haline getirilmiş *A. officinalis* bitkisinin *D. melanogaster*'de herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı belirlenmiştir. Buna ilaveten, yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda *A. officinalis* bitkisinin test edilen tüm dozlarının, *Drosophila*'da MMC tarafından indüklenen DNA hasarını baskılayarak antigenotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna bağlı olarak bitkinin bir takım antigenotoksik etki gösteren faktörler içerdiği söylenebilir. Yapılan pek çok çalışmada, *A. officinalis* bitkisinin özellikle yaprak ve çiçeklerinin çok sayıda fenolik bileşik içerdiği saptanmıştır. Bu bağlamda literatürde *A. officinalis* bitkisi ile hazırlanan farklı ekstraktların *in vivo* ve *in vitro* antioksidan, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve sitotoksik etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur (Kaya, 2013). Sahip olduğu genetik özellikler nedeniyle, deneysel çalışmalarda en çok kullanılan model organizmalardan olan *Drosophila* ile yapılan bu *in vivo* çalışma ile birlikte, *A. officinalis* bitkisinin antigenotoksik aktivitesi *D. melanogaster* üzerinde ilk kez araştırılmıştır. Bu bağlamda çalışmanın halk sağlığı açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmanın konusunun daha iyi aydınlatılması, bulgularımızın desteklenmesi ve antigenotoksikite mekanizmasının netleştirilmesi adına,

bitkinin farklı şekildeki ekstraksiyonları ve farklı kısımlarının değerlendirilmesi gibi daha ileri ve farklı çalışmaların yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Al Snafi, A. E. (2013). The pharmaceutical importance of althaea officinalis and althaea rosea: A review. *International journal of pharmtech research*, 5, 1378–1385.
- Boldbaatar, D., El-Seedi, H. R., Findakly, M., Jabri, S., Javzan, B., Choidash, B., ...Hellman, B. (2014). Antigenotoxic and antioxidant effects of the Mongolian medicinal plant *Leptopyrum fumarioides* (L): An in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 599-606.
- El-Hefny, I., Hozayen, W., AlSenosy, N., Basal, W., Ahmed, A. ve Diab, A. (2020). Evaluation of genotoxicity of three food preservatives in *drosophila melanogaster* using smart and comet assays. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(1), 38-41.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. ve Kale, P.G. (1984). Somatic mutation test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6, 153–188.
- Idaomar, M., El Hamss, R., Bakkali, F., Mezzoug, N., Zhiri, A., Baudoux, D., ...Alonso-Moraga, A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 513, 61-68.
- Karabulut, A. K. ve Yesilada, E. (2014). Genotoxicity testing of tributyltin and methidathion in *drosophila melanogaster* using the wing somatic mutation and recombination test. *FEBS*, 23, 3476-3481.
- Kaya, G. Ö. (2013). *Althaea officinalis* L. bitkisinin fitoterapi yönünden değerlendirilmesi. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Khalighi, N., Jabbari-Azad, F., Barzegar-Amini, M., Tavakkol-Afshari, J., Layegh P. ve Salari, R. (2021). Impact of *Althaea officinalis* extract in patients with atopic eczema: a double-blind randomized controlled trial. *International Journal of Phytomedicine and Phytotherapy*, 7, 73.
- Niikawa, M. ve Nagase, H. (2007). Effect of aspirin on DNA damage induced by MMC in *Drosophila*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(5), 250-253.
- Önen, Ö., Kılıçle, P. A. ve Doğan, A. N. C. (2017). Baharat olarak kullanılan bazı bitki ekstraktlarının memeliler üzerindeki genotoksik-antigenotoksik etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bil. Enstitüsü Der.*, 10(2), 103-115.
- Özdemir, K. Y. (2018). *Kantaron (hypericum perforatum) ve hatmi çiçeği (althaea officinalis) sulu metanolik özütünün gökkuşağı alabalığının (oncorhynchus mykiss) büyüme performansı, sindirim enzimleri ve bazı bağışıklık parametreleri üzerine etkileri*. Yayınlanmamış Doktora Tezi. Kastamonu Üniversitesi.
- Rincon, J. G. ve Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a Biomonitor. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change Plenum Press*, 169-179.
- Şeker, S. K. (2019). *Türk lokumu üretiminde hatmi (Althaea officinalis L.) Kökü kullanımının lokumun kalite özelliklerine etkisi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Shabab, S., Gholamnezhad, Z. ve Mahmoudabady, M. (2021). Protective effects of medicinal plant against diabetes induced cardiac disorder: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113328.
- S-Radak, M. ve Andjelkovic, M. (2016). Studying genotoxic and antimutagenic effects of plant extracts in *Drosophila* test systems. *Botanica Serbica*, 40(1), 21-28.
- Sümer, S., Öner, R., Ögüş, A. ve Açık, L. (2009). *Genetik Kavramlar*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Zor, M. ve Aslan, E. L. (2020). Assessment of in vitro antigenotoxic effect of *Nigella sativa* oil. *TJPS*, 17(1), 115-118.